

SÉRIE A, N° 794

N° D'ORDRE :

820

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(MENTION SCIENCES)

PAR

Yvon CROISILLE

1^{re} THÈSE. — Action de différents extraits d'organes sur l'embryon de Poulet et sur des organes embryonnaires cultivés *in vitro*.

2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 21 mars 1958 devant la Commission d'examen.

MM. GRASSÉ,	<i>Président.</i>
MAY,	{ <i>Examineurs.</i>
LENDER,	

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain, PARIS (VI^e)

1959

SÉRIE A, N° 794

N° D'ORDRE :

820

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(MENTION SCIENCES)

PAR

Yvon CROISILLE

1^{re} THÈSE. — Action de différents extraits d'organes sur l'embryon de Poulet et sur des organes embryonnaires cultivés *in vitro*.

2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 21 mars 1958 devant la Commission d'examen.

MM. GRASSÉ, *Président.*
 MAY, {
 LENDER, } *Examineurs.*



MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain, PARIS (VI^e)

1959

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen J. PÉRÈS.

PROFESSEURS

G. JULIA	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	WIEMANN	T Chimie org. et structur.
FOCH	T Mécanique phys. et expér.	JACQUINOT	T Spectroscopie et physique céleste.
PAUTHENIER	T Electrotechnique générale.	VASSY	T Physique de l'atmosph.
De BROGLIE	T Théories physiques.	DESTOUCHES	T Théories physiques.
PRENANT	T Anat. et Histol. comp.	M. PRUVOST	T Géologie.
GARNIER	T Géométrie supérieure.	AMIEL	T Chimie gén. (P. C. B.).
PÉRÈS	T Mécan. des fluides et appl.	HOCART	T Minéralogie.
LAUGIER	T Physiologie générale.	J.-P. MATHIEU	T Physique (P. C. B.).
M. CURIE	T Physique (P. C. B.).	COUTEAUX	T Biologie animale (P.C.B.).
BARRABÉ	T Géol. struct. et géol. appl.	MAY	T Biologie animale (P.C.B.).
G. DARMOIS	T Calcul des probabilités et Physique mathémat.	CHOQUET	T Calcul différent. et intégr.
Jacques BOURCART	T Géogr. phys. et géol. dyn.	FELDMANN	T Biologie (P. C. B.).
PLANTEFOL	T Botanique.	GUINIER	T Physique gén. (P. C. B.).
GRASSÉ	T Evol. des êtres organisés.	JOST	T Physiologie comparée.
PRÉVOST	T Chimie organique.	FORTET	T Calcul des probabilités.
BOULIGAND	T Application de l'analyse à la Géométrie.	SCHWARTZ	T Méth. math. de la phys.
CHAUDRON	T Chimie appliquée.	CHOUARD	T Physiologie végétale.
WYART	T Minéralogie.	MALAVARD	T Aviation.
TEISSIER	T Zoologie.	BRELOT	T Calcul différentiel.
MANGENOT	T Biologie végétale.	NORMANT	T Chimie organique.
P. AUGER	T Physique quantique et relativité.	BENARD	T Chimie (P. C. B.).
MONNIER	T Physiol. des fonctions.	BUVAT	T Botanique (E. N. S.).
PIVETEAU	T Paléontologie.	DUGUE	T Statistiques mathémat.
ROCARD	T Physique (E. N. S.).	GELOSO	T Chimie (S. P. C. N.).
H. CARTAN	T Mathématiques (E. N. S.).	SOULAIRAC	T Psychophysiologie.
LAFITTE	T Chimie générale.	ULRICH	T Physiologie végétale.
FAVARD	T Mécanique générale.	MARECHAL	T Optique théorique et appliquée.
COULOMB	T Physique du Globe.	KIRRMANN	T Théories chimiques.
M ^{lle} COUSIN	T Biol. anim. (S. P. C. N.).	CHADEFAUD	T Botanique.
CHRÉTIEN	T Chimie minérale.	DESTRIAU	T Physique (M. P. C.).
P. DRACH	T Zoologie.	M ^{lle} LE BRETON	T Physiologie générale.
KASTLER	T Physique.	SALEM	T Mathématiques générales.
EPHRUSSI	T Génétique.	LELONG	T Mathématiques générales.
WURMSER	T Biol. physico-chimique.	DEVILLERS	T Anat. et histol. comp.
RIVIÈRE	T Géologie (S. P. C. N.).	EHRESMANN	T Topologie algébrique.
GAUTHERET	T Biologie végétale (P.C.B.).	FRANÇON	T Physique (S. P. C. N.).
LUCAS	T Recherches physiques.	GLANGEAUD	T Géogr. phys. et géol. dyn.
A. THOMAS	T Biologie cellulaire.	GODEMENT	T Mathématiques (M. P. C.).
ARNULF	T Optique appliquée.	PISOT	T Calcul des probabilités.
MAX MORAND	T Enseig. de physique.	E. ROCH	T Géologie.
SOLEILLET	T Physique.	SCHATZMANN	T Astrophysique.
FORTIER	T Mécan. expér. des fluides.	TERMIER	T Paléontol. stratigraph.
DANJON	T Astronomie.	ZAMANSKY	T Mathémat. générales.
LAPORTE	T Phys. gén. et Radioact.	JOLIOT	T Phys. nucl. et radioact.
JANET	T Mécanique analytique et Mécanique céleste.	LENNUIER	T Physique (P. C. B.).
PETIT	T Biologie maritime.	RIZET	T Génétique.
QUENEY	T Météorologie et dynamique atmosphérique.	M ^{me} TONNELAT	T Théories physiques.
GALLIEN	T Embryologie.	DIXMIER	T Mathématiques (M. P. C.).
EICHHORN	T Biologie végétale (P.C.B.).	SOUCHAY	T Chimie générale.
De CUGNAC	T Biologie végétale (P.C.B.).	AIGRAIN	T Physique (P. C. B.).
M ^{lle} CAUCHOIS	T Chimie physique.	BRUSSET	T Chimie minérale.
THELLIER	T Physique du Globe.	M. LÉVY	T Physique théorique.
L'HÉRITIER	T Génétique.	LENORMANT	T Physiologie.
GRIVET	T Radio-Electricité.	M ^{me} CHAIX	T Chimie biologique.
PONCIN	T Mécanique des fluides.	M ^{me} HUREL-PY	T Biol. végétale (P. C. B.).
DUBREIL	T Arithmétique et théorie des nombres.	PIAUX	T Chimie (P. C. B.).
QUELET	T Chimie organique.	BRUN	T Mécan. expér. des fluides.
CAGNIARD	T Géophysique appliquée.	LEDERER	T Chimie biologique.
CHAMPETIER	T Chimie macromolécule.	M ^{me} DUBREIL	T Mathématiques.
CUVILLIER	T Géol. struct. et géol. appl.	M ^{me} LELONG	T Mathématiques (E. N. S.).
JUNG	T Pétrographie.	BELLAIR	T Géologie (S. P. C. N.).
TRILLAT	T Microscopie et diffraction électronique.	COTTE	T Physique (M. P. C.).
		J.-E. DUBOIS	T Chimie (S. P. C. N.).
		LAMOTTE	T Zoologie (E. N. S.).
		MICHEL	T Chimie (S. P. C. N.).
		OLMER	T Energétique générale.
		ROUAULT	T Physique (Enseig.).
		GAUTHIER	T Mécanique appliquée.

Secrétaire général CH. MONIER.

AVANT-PROPOS

La régulation de la croissance des organes différenciés et les mécanismes qui la régissent ont déjà fait l'objet de nombreuses discussions. Des observations, telles que la stimulation de la croissance du foie, consécutive à des greffes de fragments de foie sur la membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon de Poulet, ou la croissance compensatrice du métanéphros après destruction partielle, ont conduit P. WEISS à schématiser ces mécanismes dans une théorie établissant que chaque organe sécrète ses propres inhibiteurs. Ainsi, l'ablation du métanéphros se traduit par l'enlèvement partiel d'une source d'inhibiteur homologue, ce qui permet à l'organe restant de reprendre sa croissance.

Cette hypothèse a été étayée de nombreux résultats expérimentaux ; cependant, les données relatives à la spécificité des actions et à la possibilité d'étendre une telle explication à l'ensemble des organes de l'embryon restaient incomplètes et obscures.

Il était intéressant de tenter quelques expériences en vue de contribuer à cette étude; voilà le sujet que me confia mon maître, M. le P^r ET. WOLFF. Plus précisément, c'est vers le domaine de l'activité stimulatrice des extraits d'organes que devaient s'orienter mes premières recherches. J'exposerai au cours de ce travail comment sont nés, au fur et à mesure, les problèmes de la culture d'organes sur extraits homo- ou hétérologues.

Ce n'est pas sans appréhension que j'ai abordé ce problème, apparaissant aussi vaste que complexe. Mais, confiant dans les directives de mon maître, me sentant dès le début soutenu par ses nombreux conseils, et bénéficiant de l'atmosphère de collaboration qui règne dans son laboratoire, j'ai pu entreprendre cette tâche sans trop d'hésitations ni de tâtonnements. Je tiens à lui exprimer ici toute ma reconnaissance et le prie d'agréer l'hommage de ce travail en témoignage de ma plus profonde gratitude.

M. le P^r P. P. GRASSÉ a bien voulu accepter la présidence du jury chargé d'examiner cette thèse; je le prie d'agréer mes plus sincères remerciements.

J'exprime aussi tous mes remerciements à M. le P^r TULASNE qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire, où j'ai pu, sous sa direction, m'initier aux techniques immunologiques, et à M. le P^r P. GRABAR, pour les conseils qu'il me donna lors de l'interprétation des effets obtenus avec les antisérums.

ACTION DE DIFFÉRENTS EXTRAITS D'ORGANES SUR L'EMBRYON DE POULET ET SUR DES ORGANES EMBRYONNAIRES CULTIVÉS *IN VITRO*

Par YVON CROISILLE

(Laboratoire d'Embryologie et de Tératologie expérimentales
du Collège de France et du C. N. R. S.
Directeur : ETIENNE WOLFF.)

SOMMAIRE

I. — Historique	360
II. — Matériel et méthodes	362
III. — Résultats	365
1° Effets produits par des injections d'extraits de foie et de rate à des embryons de Poulet	365
A) Effets généraux sur le poids de l'embryon	365
B) Effets sur les organes de l'embryon	366
2° Action de sérums antifoie sur le foie de l'embryon de Poulet	368
3° Action de l'extrait de foie en culture	370
A) Cultures sur milieu standard	370
B) Cultures sur milieu T (à base de liquide de Tyrode seulement) ..	375
C) Cultures sur milieu à base d'extrait de foie	375
4° Action d'autres extraits d'organes en culture	381
A) Cultures sur extrait de mésonéphros	383
B) Cultures sur extrait d'intestins	384
C) Cultures sur extrait de peau	385
D) Cultures sur extrait de poumon	387
5° Différenciation d'un organe en présence de son propre extrait	388
IV. — Discussion et conclusions	393
Résumé	397

I. — HISTORIQUE

L'idée de stimuler les fonctions de l'organisme par des extraits d'organes n'est pas nouvelle. Dès la plus haute antiquité on a loué l'action bienfaisante de divers extraits d'organes. Mais tous les essais n'ont jamais été qu'empiriques et après le XVII^e siècle la méthode sombra dans l'oubli. Il a fallu attendre CLAUDE BERNARD et BROWN-SEQUARD pour que le problème fasse l'objet d'une étude scientifique systématique.

En 1899, E. METCHNIKOFF, au cours d'une étude sur la résorption des cellules, publie que des sérums antiorganes, toxiques à forte concentration, peuvent être stimulants à faible concentration. Peu à peu l'idée d'une spécificité éventuelle se fit jour, et le problème suscita l'intérêt de nombreux chercheurs. Du point de vue théorique, la compréhension des effets stimulants devait permettre de jeter quelque lumière sur le mécanisme encore très obscur de la croissance; d'un point de vue pratique, la possibilité de réveiller ou de stimuler les fonctions d'un organe devait trouver son application en thérapeutique.

Dès lors, de nombreux travaux ont été consacrés à l'étude des phénomènes de stimulation.

Ainsi, en 1943, A. BOGOMOLETZ montre la possibilité de stimuler le système réticulo-endothélial avec des sérums antirate et antimœlle. En 1947, C. M. POMERAT confirme la nature cytotoxique du sérum antirate, mais, d'après ses résultats, les effets stimulants sont moins certains. Au contraire, la même année, P. WEISS trouve que des sérums antifoie et antirein déterminent chez les hôtes une augmentation sensible du poids du foie et des reins.

Alors que POMERAT n'avait pu obtenir d'accroissement de la rate après injection de sérum antirate, il a remarqué que les greffes chorio-allantoïdiennes de rates d'embryons de Poulet âgés déterminaient un accroissement énorme de la rate d'embryons de Poulets hôtes. Il vérifiait ainsi un résultat qui fut observé, en premier, par J. B. MURPHY (1916), V. DANTCHAKOFF (1916-1918), et B. H. WILLIER, en 1924. Des résultats semblables, concernant l'action de greffons de foie d'embryons de Poulet de 6 jours sur embryons de 4 jours, sont rapportés par P. WEISS et H. WANG (1941), et par P. WEISS (1947), qui observent un accroissement considérable des foies chez les embryons traités. Plus récemment, J. D. EBERT (1951) démontre le rôle de l'âge du greffon dans les phénomènes de stimulation de la rate de l'embryon de Poulet : les greffons sont d'autant plus actifs que le donneur est plus âgé.

Cependant les effets observés ne sont pas complètement spécifiques.

Parallèlement à l'accroissement du foie, WEISS et WANG observent une légère augmentation du rein. Par ailleurs, des greffes de caillots sanguins, de peau et de mésonéphros amènent une légère augmentation du poids des foies. EBERT remarque que si l'effet obtenu n'est pas « *organ-specific* », il est « *class-specific* ». En effet, si des greffes de thymus et de foie de Poulet déterminent chez l'embryon de Poulet une légère augmentation du poids des rates, des greffes d'organes de Souris n'ont aucun effet.

Il ne faut toutefois pas perdre de vue que dans toutes ces expériences les stimulations homologues sont les principales.

Ces observations ont suscité de nombreuses hypothèses d'explication dont beaucoup ont été rejetées par la majorité des auteurs.

Entre beaucoup d'autres interprétations, V. DANTCHAKOFF pensait à une réaction d'immunité où l'antigène du greffon stimulerait la production d'anticorps dans l'organe concerné. Mais EBERT a établi qu'aucun anticorps circulant n'est formé durant la vie embryonnaire et, de plus, on peut difficilement admettre que des anticorps se forment vis-à-vis des constituants cellulaires de la même espèce, et pas vis-à-vis de greffons provenant d'une espèce différente.

L'hypothèse communément admise à l'heure actuelle correspond à l'idée du « *template growth concept* » émise par P. WEISS (1947) et A. TYLER (1947). Ces auteurs pensent que le mécanisme de la croissance peut être considéré comme analogue au mécanisme de la formation d'un anticorps produit à la suite de l'incorporation d'un antigène. Dans certaines conditions, l'antigène d'un organe, introduit à un moment de synthèse active, servirait de « *molécule-modèle* », et catalyserait la formation d'antigène additionnel homologue, ce qui conduirait à une croissance plus grande de l'organe correspondant. Ainsi les protéines d'un organe agiraient directement comme des noyaux de synthèse quand elles entrent dans l'environnement approprié. L'augmentation de croissance du foie, consécutive à des greffes de fragments de foie, résulterait du fait que les protéines hépatiques, transportées du greffon vers le foie de l'hôte, y activent la formation de protéines supplémentaires et identiques.

Dans un même ordre d'idées, D. BONNETTI (1952) rapporte que l'administration de broyats de foie fonctionnel à des embryons de Poulet active la multiplication cellulaire dans le foie, et ceci d'autant plus que l'injection est pratiquée à des stades plus jeunes. En 1955, G. ANDRÈS montre par des injections intra-vasculaires de suspensions de cellules hépatiques et mésonéphrétiques fraîches et congelées que l'action stimulatrice n'est pas nécessairement due à l'addition de cellules viables et de leurs produits, mais plutôt à des substances qui ont diffusé à la suite de la séparation des cellules. Il interprète les résultats suivant la théorie de

P. WEISS (1955), d'après laquelle la synthèse protéique d'un type cellulaire donné dépend de la présence :

a) de grosses molécules prenant part à la construction de protoplasme type-spécifique et confinées à l'intérieur de la cellule;

b) de composants plus petits, diffusibles et de même spécificité, circulant à travers tout le corps. Ces derniers, combinés aux premiers, les inactivent et réduisent la croissance homologue. Chaque type cellulaire produirait ainsi les inhibiteurs de sa propre espèce.

Ceci expliquerait les réactions de croissance consécutives à des injections de débris d'organes. L'augmentation de croissance résulterait du fait que les composés *a*, libérés de leur confinement intra-cellulaire dans le sang, réduisent temporairement la concentration d'inhibiteurs homologues en se combinant avec eux.

Devant la diversité même des résultats, et devant le nombre d'hypothèses émises, on est amené à se rendre compte de la complexité du problème. Sans vouloir reprendre toutes ces expériences, nous nous sommes demandé quels seront les effets produits par des injections d'extraits de foie et de rate sur de jeunes embryons de Poulet. D'un autre côté, nous nous sommes proposé d'étudier l'action de quelques extraits sur des organes embryonnaires cultivés *in vitro*. Cette méthode devait nous permettre d'étudier le phénomène en dehors de toute relation avec l'organisme, et nous donner une idée sur la nature et le mécanisme de la stimulation. L'on pouvait en effet se demander si les effets observés sur l'embryon résultent d'une action directe ou indirecte. Autrement dit, il s'agissait de savoir si les substances injectées, véhiculées par le courant sanguin vers l'organe homologue, agissent telles quelles, ou si, au contraire, elles n'agissent qu'avec le concours de quelque substance présente dans l'embryon.

La méthode de culture devait nous permettre de mettre le foie en contact direct avec son propre extrait et, de plus, nous donner des indications sur la spécificité. Nous verrons ultérieurement comment nous avons été amené à cultiver d'autres organes sur des extraits homo ou hétérologues.

II. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. — Préparation des extraits.

Toutes les opérations ont été faites sur l'embryon de Poulet Leghorn blanc (éventuellement sur des poussins et Poulets Leghorn). Les extraits employés ont été préparés à partir de foies d'embryons de 9 jours, 17 jours et de Poulets, d'une part, et à partir de rates de Poussins et de Poulets adultes, d'autre part. Dans tous les cas, nous avons pris soin d'enlever la vésicule biliaire. Les organes

ont été prélevés avec toutes les précautions de stérilité requises, rapidement lavés dans du Ringer, puis broyés dans un mortier en agate avec du sable stérile, jusqu'à obtention d'une masse homogène. Ensuite le broyat a été repris avec du Ringer à raison de 1 volume-1 volume, et ceci de la manière suivante : la moitié du Ringer destiné à la dilution a été ajoutée tout de suite au broyat, et la masse ainsi obtenue transvasée dans un tube de centrifugation stérile; l'autre moitié a été gardée pour laver le mortier et ajoutée ensuite. Après centrifugation pendant 20 à 30 minutes à environ 6 000 t. p. m. (environ 2 600 g), l'extrait obtenu a été recueilli et maintenu à la glacière jusqu'à utilisation, à une température de + 5°. En aucun cas le séjour à la glacière n'a dépassé 48 heures.

B. — *Technique d'injection et calcul des résultats.*

Les œufs destinés à être injectés ont été préparés selon la méthode décrite par ET. WOLFF, en 1936. Après les avoir soigneusement lavés avec un tampon de coton imbibé d'alcool, on retire, par une petite ouverture faite au pôle antérieur, la quantité d'albumine nécessaire à abaisser légèrement le niveau dans l'œuf. Nous avons veillé à prélever la même quantité sur tous les œufs, afin d'éviter des variations qui auraient pu troubler les résultats. Avant de pratiquer une ouverture d'environ 2 cm de diamètre dans la partie supérieure, nous avons placé les œufs sur un support pendant quelques minutes, temps nécessaire à la stabilisation de l'embryon au pôle apical. Après chaque opération l'œuf est refermé avec une lamelle de mica lutée avec de la paraffine.

Trois injections successives de 0,05 cm³ ont été faites à des intervalles de 24 heures. La première injection a été faite entre 3 et 3 jours 1/2 d'incubation. Les extraits ont été déposés en petites gouttes sur l'aire vasculaire. Parallèlement, des injections de la même quantité de Ringer ont été faites aux témoins. Les embryons ont alors été maintenus en incubation à 37°5 jusqu'à l'autopsie, qui fut pratiquée aux 12^e, 14^e, 16^e, 17^e et 18^e jours soit 7, 9, 11, 12 et 13 jours après la dernière injection. A l'autopsie, les embryons ont été prélevés, débarrassés de toutes les annexes, lavés dans du Ringer, légèrement séchés et pesés au décigramme le plus proche. Ensuite nous avons prélevé les organes. Pour éviter des variations de poids trop grandes dues à l'évaporation pendant le temps que dure l'opération et la pesée, nous avons jugé bon de les fixer dans le liquide de Bouin pendant 24 heures. Une fois fixés ils ont été rapidement lavés dans de l'eau distillée, séchés entre deux paquets de 5 feuilles de papier-filtre, et pesés au milligramme le plus proche.

La différence entre les témoins et les traités a été calculée d'après la différence des rapports poids de l'organe-poids total de l'embryon. Dans tous ces calculs nous avons tenu compte de l'approximation permise par les calculs d'erreurs effectués avec les données numériques relevées dans les conditions les plus défavorables.

Les calculs de probabilité ont été effectués d'après la méthode de comparaison de deux moyennes de STUDENT-FISHER.

Les poids des embryons et des foies sont nettement plus faibles que ceux rapportés par J. C. WESTON (1956). Cette différence peut être attribuée au fait que, dans le cas présent, nous avons prélevé de l'albumine. Cependant les rapports poids du foie-poids de l'embryon concordent assez bien avec les résultats de l'auteur (tableau I). On voit que la courbe de croissance du foie par rapport au poids total passe par un maximum à 17 jours, pour subir une chute brusque au 18^e jour.

TABLEAU I

Age des embryons	Poids du foie Poids total	PF/PE d'après WESTON
12 jours.	0,015	0,017
14 jours.	0,016	0,017
16 jours.	0,021	0,021
17 jours.	0,023	0,022
18 jours.	0,020	0,020

C. — Méthode de culture.

Les cultures ont été faites suivant la méthode mise au point par Et. WOLFF et K. HAFEN (1952). Les extraits employés ont été préparés selon le procédé précédemment décrit; toutefois les opérations ont été faites dans du Tyrode. Les organes mis en culture ont généralement été prélevés sur l'embryon de Poulet Leghorn de 9 jours. D'une façon générale, nous avons cultivé : le foie, le mésonéphros, le poumon, les gonades et l'intestin. Dans le cas des gonades et de l'intestin, l'organe entier ou des fragments d'organes ont été explantés. Dans le cas du foie, du mésonéphros et du poumon, la technique d'explantation a consisté à prélever des fragments très plats pour permettre à toutes les cellules de se trouver dans les meilleures conditions possibles de respiration. Les explants ainsi préparés ont été lavés dans du Tyrode, placés sur le milieu de culture, soigneusement asséchés et mis en incubation à 37°5.

Nous avons comparé l'évolution des cultures sur les milieux expérimentaux à deux séries de cultures témoins. Une première catégorie de cultures témoins a été réalisée sur le milieu standard (S) à base de jus d'embryons. La deuxième série de témoins a été constituée par des milieux dépourvus de toute substance nutritive (T). La composition de ces milieux a été définie par Et. WOLFF et K. HAFEN (tableau II).

TABLEAU II

Milieux	Gélose	Tyrode	Extraits
S	7 volumes.	3 volumes.	3 volumes d'extrait embryonnaire.
T	7 volumes.	6 volumes.	0
X	7 volumes.	3 volumes.	3 volumes d'extrait étudié.

D. — Tests d'efficacité des milieux de culture.

Les critères d'évolution d'une bonne culture que nous avons employés sont :

— la survie ou la nécrose, d'après l'aspect extérieur et l'aspect histologique de la culture;

— la propriété qu'ont deux explants associés de se fusionner en une seule masse, de sorte qu'il devient impossible après 2 à 3 jours de culture, de distinguer leurs limites primitives. Cette dernière propriété nous a paru être un bon critère pour qualifier l'efficacité d'un milieu. En effet, comme nous le verrons

au cours de ce travail, sur un milieu insuffisant, jamais aucune fusion intime n'a pu être observée. Les explants peuvent tout au plus s'accoler mais ils garderont toujours leur individualité propre, sans jamais se mêler intimement.

Pour favoriser l'association des tissus mis en présence nous avons fréquemment employé la méthode du morcellement des fragments et leur rassemblement en mosaïque préconisée par Et. WOLFF (1954).

Les observations en culture ont été contrôlées par l'étude histologique. Les explants destinés à être examinés ont été fixés dans le liquide de Bouin pendant 24 heures, inclus dans la paraffine, coupés à 5 ou 7 microns et colorés au glychémalun-éosine.

Nous avons établi l'efficacité des milieux comme suit : pour les gonades, l'intestin et le mésonéphros nous avons calculé directement le pourcentage de bonnes cultures à partir du nombre d'explants qui ont survécu pendant plus de 5 jours sans aucune apparition de nécrose. La culture d'un organe aussi fragile que le foie ne dépendant pas seulement du milieu, mais en grande partie de l'explant lui-même, de sa taille, de son épaisseur et des lésions plus ou moins importantes subies à l'implantation, le relevé des résultats a été fait en deux temps : d'abord nous avons calculé le pourcentage de bonnes cultures d'après leur évolution extérieure, leur degré d'homogénéisation et d'association. Dans un deuxième temps nous avons considéré le nombre de cultures dont la survie a dépassé 5 jours sans qu'il y ait manifestation d'aucun phénomène de nécrose périphérique. La moyenne des deux pourcentages ainsi obtenus a été retenue pour servir de base à la qualification de l'efficacité des milieux.

Cette méthode a été adoptée à la suite de deux observations :

a) des explants peuvent très bien homogénéiser leurs contours et se nécroser par suite de la fragilité de l'organe;

b) des explants non ou à peine associés peuvent, à l'histologie, se révéler être en bonne survie et présenter des cellules saines.

La moyenne des différents pourcentages ainsi obtenus a servi à la classification des milieux.

III. — RÉSULTATS

1° EFFETS PRODUITS

PAR DES INJECTIONS D'EXTRAITS DE FOIE ET DE RATE A DES EMBRYONS DE POULET

A. — EFFETS GÉNÉRAUX SUR LE POIDS DE L'EMBRYON

Des injections d'extraits de foie embryonnaire de Poulet de 9 et de 17 jours ont donné lieu à une diminution très faible, mais constante, du poids de l'embryon.

L'administration d'extraits de foie de Poussins et d'adultes ont, au contraire, augmenté ce poids de 16 %. Ce dernier résultat se trouve confirmé par le fait que des injections d'extraits de rate, tous préparés à partir de Poussins et de Poulets adultes, ont eu un effet analogue, augmentant le poids des embryons hôtes de 25 %.

Aucun de ces résultats n'est statistiquement significatif (tableau III).

TABLEAU III

EFFETS D'INJECTIONS D'EXTRAITS DE FOIE ET DE RATE
SUR LE POIDS TOTAL DES EMBRYONS

Nature de l'extrait injecté	Nombre de témoins	Nombre de traités	Poids moyen témoins	Poids moyen traité	Diffé- rence en %	T de Student- Fisher	P (1)
Extrait de foie 9 jours...	36	36	7,1 g	6,7 g	— 5	0,46	0,64
Extrait de foie 17 jours...	26	35	7,9 g	7,7 g	— 3	—	—
Extrait de foie adulte....	12	12	6,5 g	7,5 g	+ 16	0,69	0,47
Extrait de rate adulte....	14	25	7,8 g	9,8 g	+ 25	1,85	0,06

(1) p étant la probabilité d'obtenir l'écart en cause par le seul fait des fluctuations du hasard, on voit qu'en admettant pour seuil $p = 0,05$ aucun de ces résultats n'est significatif.

B. — EFFETS SUR LES ORGANES DE L'EMBRYON

Des injections d'extrait de foie ont de façon constante augmenté la croissance des foies chez les hôtes, et le taux de stimulation s'est révélé être fonction de l'âge de l'extrait.

Si l'extrait de foie embryonnaire de 9 jours n'a donné qu'une augmentation moyenne de 8 % ($p = 0,29$; résultat non significatif), l'extrait de 17 jours a été plus actif, et l'augmentation de croissance moyenne a été de 16 % ($p = 0,02$; résultat significatif) (tableau IV).

TABLEAU IV

EFFETS DE L'EXTRAIT DE FOIE SUR LE FOIE DE L'HÔTE

Age de l'extrait	Nombre de témoins	Nombre de traités	Augmen- tation moyenne en %	T	p
Foie de 9 jours...	36	36	+ 8	1,04	0,29
Foie de 17 jours...	26	35	+ 16	2,23	0,02
Foie adulte.....	12	12	+ 3	0,62	0,53

Les résultats obtenus à la suite d'injections d'extrait de foie adulte méritent une attention particulière. En effet, l'augmentation moyenne observée n'a été que de 3 %. Mais, si on considère l'effet de stimulation général, exercé sur le poids total de l'embryon, on voit que cet effet masque l'action particulière sur le foie. Si pour une même valeur de PF, le poids total de l'embryon augmente, le rapport PF/PE diminue. Dans

TABLEAU V

CONSTANCE DES EFFETS DE L'EXTRAIT DE FOIE SUR LE FOIE DE L'HÔTE

Série	Âge de l'extrait	PF/PE témoins	PF/PE traités	Différence en %
1.	9 jours.	0,0230	0,0238	+ 3
2.	9 »	0,0170	0,0204	+ 20
3.	9 »	0,0166	0,0203	+ 22
4.	9 »	0,0226	0,0238	+ 5
5.	9 »	0,0240	0,0248	+ 3
6.	9 »	0,0173	0,0202	+ 16
7.	9 »	0,0158	0,0159	+ 1
8.	9 »	0,0181	0,0187	+ 3
9.	17 »	0,0182	0,0255	+ 40
10.	17 »	0,0250	0,0259	+ 4
11.	17 »	0,0243	0,0248	+ 2
12.	17 »	0,0249	0,0293	+ 18
13.	Poussins.	0,0166	0,0183	+ 10
14.	»	0,0145	0,0145	0
15.	»	0,0163	0,0161	— 1

TABLEAU VI

ACTION DE L'EXTRAIT DE FOIE SUR LE FOIE ET LA RATE DE L'HÔTE

Série	Effet sur le foie	PR PE témoin	PR PE traité	Effet sur la rate
	%			%
2.	+ 20	0,00045	0,00040	— 11
12.	+ 18	0,00052	0,00048	— 7
10.	+ 4	0,00049	0,00042	— 14
8.	+ 3	0,00044	0,00047	+ 9
11.	+ 2	0,00033	0,00033	0
7.	+ 1	0,00031	0,00057	+ 83
14.	0	0,00019	0,00029	+ 52
15.	— 1	0,00028	0,00034	+ 21

TABLEAU VII

ACTION DES INJECTIONS D'EXTRAIT DE RATE

Effets sur la rate				Effets sur le foie		
Série	PR PE témoin	PR PE traité	Effet en %	PF/PE témoin	PF/PE traité	Effet en %
1.	0,00019	0,00020	+ 5	0,0148	0,0131	— 11
2.	0,00035	0,00055	+ 57	0,0200	0,0182	— 9
3.	0,00029	0,00033	+ 13	0,0161	0,0181	+ 12
4.	0,00032	0,00032	0			

le cas présent, le rapport PF/PE des embryons traités est malgré cela supérieur au rapport PF/PE témoin, et on peut affirmer que l'action particulière sur le foie a été d'autant plus considérable.

Des injections d'extraits de rate de Poussins et de Poulets adultes ont aussi déterminé une augmentation de la croissance de la rate chez les hôtes. Pour un total de 14 témoins et de 25 traités, l'augmentation moyenne, calculée à partir de la différence des rapports PR/PE traités-PR/PE témoins, est de 18 % (tableau VII). T étant égal à 1,80, $p = 0,07$. La différence observée n'est pas significative. Notons cependant que nous nous trouvons très près du seuil de signification ($p = 0,05$).

Toutefois ces effets de stimulation ne sont pas complètement spécifiques. Sur 43 témoins et 55 injectés avec extrait de foie observés, nous avons pu constater une augmentation moyenne de la rate de 16 % en faveur des traités. Mais l'effet sur la rate n'est pas constant et, de plus, semble s'exercer en raison inverse de l'effet sur le foie (tableau VI).

Le mésonéphros se trouve aussi affecté par les injections d'extrait de foie. Sur 12 témoins et 19 injectés, une différence de 13,5 % a été notée en faveur des traités.

L'action de l'extrait de rate sur le foie est aussi très variable, et d'une façon générale la croissance du foie semblerait plutôt inhibée. Mais ne reposant que sur 12 cas, cette observation ne peut donner lieu à des conclusions valables (tableau VII).

De ces résultats, il ressort que les effets d'injections d'extraits de foie et de rate s'exercent essentiellement sur l'organe homologue. Bien que les effets non spécifiques soient dans certains cas plus importants que les effets homologues, ils sont inconstants, et ne sauraient être considérés comme significatifs.

D'après les calculs de probabilité, seule l'action de l'extrait de foie de 17 jours est significative. Cependant, la constance des effets parle en faveur d'une action certaine des extraits étudiés.

Donc, même si nous ne pouvons pas conclure à une spécificité absolue, il apparaît important de mettre en valeur l'action sélective qui s'exerce de façon constante sur l'organe correspondant (tableau V).

Si une réaction de type « antigène-anticorps » doit expliquer une telle croissance, il était intéressant de se demander quelle serait la réaction d'un organe vis-à-vis de l'administration de l'anticorps correspondant.

2° ACTION DE SÉRUMS ANTIFOIE SUR LE FOIE DE L'EMBRYON DE POULET

Pour préparer des sérums antifoie (SAF) nous avons injecté une suspension de foie d'embryons de Poulet de 17 jours (concentration en protéines 40 %) à des lapins âgés de 6 à 8 mois.

Nous avons fait 12 injections de 2 cm³ de suspension à des inter-

valles de 4 jours. La première injection a été faite par voie sous-cutanée, les deux suivantes par voie intra-péritonéale, les 9 autres ont été par-tagées entre 1 cm³ intra-péritonéale et 1 cm³ intra-veineuse.

Un premier test, fait 4 jours après la sixième injection pour déceler la présence éventuelle d'anticorps, a été négatif. Le deuxième test, 4 jours après la dernière injection, ayant été positif, nous avons saigné les lapins 9 jours après. Ensuite, nous avons soumis le sérum recueilli à une nouvelle épreuve. Pour ce faire, nous avons incorporé l'antigène complet dans de la gélose à 10 % et nous l'avons mis en présence des antisérums à des concentrations toujours plus faibles. Nous avons pu observer des réactions de précipitation pour les concentrations de 1/10, 1/100 et 1/1 000. Au-delà aucune réaction n'a eu lieu. Cette observation rejoint un résultat de BURKE, SULLIVAN, PETERSEN et WEED (1944) qui, en préparant des antisérums envers des organes très variés du Poulet embryonnaire et adulte, avaient constaté que le titre des sérums antiorganes adultes était de l'ordre de 1/10 000, alors que le titre des sérums anti-organes embryonnaires était nettement plus faible.

Nous avons injecté ces antisérums à des embryons de Poulet de 3 à 3 jours 1/2 d'incubation suivant la méthode antérieurement décrite. Parallèlement, les témoins ont reçu la même quantité de sérum de lapin témoin.

Pour 20 témoins et 31 traités, nous avons observé une différence de croissance moyenne de 14 % en faveur des embryons traités avec du SAF (tableau VIII).

TABLEAU VIII

ACTION DU SÉRUM ANTIFOIE SUR LE FOIE DE L'HÔTE

Serie	PF/PE témoin	PF PE traité	Différence	Augmentation en %	Croissance moyenne
1.	0,0185	0,0214	0,0029	+ 15	+ 14 %
2.	0,0199	0,0241	0,0042	+ 21	T = 1,33
3.	0,0174	0,0185	0,0011	+ 6	p = 0,18

Bien que ce résultat ne soit pas statistiquement significatif, il est surprenant de constater que l'effet du SAF est constant et s'exerce dans le même sens. Nous rappelons que des résultats semblables avaient été obtenus par METCHNIKOFF (1899), BOGOMOLETZ (1943) et P. WEISS, en 1947.

Le parallélisme entre l'activité stimulatrice d'une solution antigénique et de son antisérum homologue est assez curieux. Cependant, si nous considérons les propriétés cytotoxiques des anticorps, nous pouvons admettre que l'antisérum exerce une action cytolytique sur certains élé-

ments cellulaires. Rien n'interdit de penser que ces lésions s'accompagnent de la libération de groupes de substances parmi lesquelles se trouveraient des éléments identiques à ceux contenus dans la solution antigénique. D'autre part, dans le cas d'un sérum antifoie, les lésions peuvent se produire dans le foie, dans un autre organe ou même sur les membranes de l'œuf au moment de la diffusion. En effet, le SAF contient un grand nombre d'anticorps dont certains seulement sont spécifiques du tissu hépatique. Il serait intéressant de reprendre cette étude et de déterminer dans quelle mesure on peut attribuer les effets stimulateurs à la présence d'anticorps spécifiques de certains constituants du foie.

D'après ces résultats il semble que l'action stimulatrice doit être attribuée à un transfert de substances à l'échelle moléculaire, plutôt qu'à un transfert de cellules ou de débris cellulaires.

3° ACTION DE L'EXTRAIT DE FOIE EN CULTURE

Avant d'étudier les résultats obtenus sur les milieux expérimentaux, donnons un aperçu de la culture sur milieux témoins.

A. — CULTURES SUR MILIEU STANDARD (A BASE DE JUS TOTAL D'EMBRYON)

Foie. — Après les tentatives de nombreux auteurs dont nous ne citerons que R. S. LYNCH (1920), O. KAPEL (1926-1928) et H. OKKELS (1929), M. NORDMAN (1929) et L. DOLJANSKI (1929) furent les premiers à montrer la possibilité d'obtenir des cultures pures de cellules hépatiques. NORDMAN, substituant un milieu à base de plasma au milieu liquide de Locke-Lewis, obtient 80 à 100 % de cultures de cellules hépatiques. DOLJANSKI, en employant de l'extrait d'embryons inactivé par la chaleur, empêche les proliférations mésenchymateuses, et obtient de larges membranes épithéliales de cellules hépatiques, caractérisées par une prolifération histiotypique.

La méthode de culture sur substrat gélosé de ET. WOLFF et K. HAFFEN nous a permis de cultiver du foie embryonnaire de Poulet en culture organotypique.

La culture de l'organe entier, comme l'a fait remarquer D. BRESCH (1955), présente de grandes difficultés. Les tissus, privés de l'apport d'oxygène par le sang, doivent respirer directement à l'air libre. Si l'explant est trop épais, le centre est privé d'oxygène et se nécrose. Aussi avons-nous prélevé de petits fragments que nous avons placés sur le milieu, soit isolément, soit en association.

Généralement les explants, une fois mis en culture à 37°5, se rétré-

cissent pour former une masse arrondie, à contours bien réguliers, ressemblant à un petit organe. Deux fragments associés commencent par s'accoler grâce à la confluence des éléments de la périphérie; cette fusion continue à s'accroître de telle sorte que, après 48 heures de culture, il est impossible de distinguer les limites des deux partenaires : la ligne de suture, encore visible entre 24 et 36 heures, a complètement disparu, et le tout ne forme plus qu'un seul ensemble, tel un fragment qui aurait été explanté isolément (fig. 1, 2 et 3).

Ce rétrécissement s'accompagne d'un épaississement au centre qui, dans certains cas, peut entraîner la nécrose centrale par asphyxie; cette dégénérescence des cellules se traduit extérieurement par l'apparition de taches blanchâtres plus ou moins délimitées.

L'histologie montre que la cicatrisation est très rapide : après 24 heures la partie lésée est fermée par une membrane conjonctive, épithéliale ou mixte, suivant que ce sont les éléments conjonctifs ou les cellules hépatiques elles-mêmes qui prennent part à sa formation (ET. WOLFF et D. BRESCH, 1955). Les noyaux sont en général ronds et présentent de beaux nucléoles fortement colorés (72 % des cas). Sur 163 explants, 10 seulement se sont nécrosés au départ de la culture (6 %), et 36 (22 %) ne sont pas devenus homogènes et présentaient des noyaux petits et anguleux, la cicatrisation n'étant pas nette.

Si normalement, à partir du 5^e jour d'incubation, le foie est un organe défini par sa structure lobulaire (KINGSBURY, ALEXANDERSON, KORNSTEIN, 1956), remarquons que, à la suite des mouvements de contraction des explants en culture, les cellules sont comprimées les unes contre les autres, et l'organisation en lobules disparaît, sauf dans quelques cas exceptionnels où une certaine structure assez atypique est maintenue.

Une telle observation rejoint un résultat obtenu par WILLIER, HARRISON et RAWLES (1931) qui, par des transplantations de jeunes blastodermes sur la membrane chorio-allantoïdienne, ont vu le foie en général se développer en une masse de tissu hépatique typique, mais sans indication de lobules ni de lobes. Parfois ils observent quelques masses isolées de cordons.

Ceci semble indiquer que la structure lobulaire du foie est sous la dépendance d'un facteur mécanique, peut-être représenté par les vaisseaux sanguins. Une fois ce facteur supprimé, la structure lobulaire disparaît et fait place à une structure massive et compacte.

Mésonephros. — Dans 56 % des cas, les explants ont montré une grande activité des éléments conjonctifs. En effet, très souvent l'on voit se former autour de l'explant une vésicule transparente. A l'histologie, cette vésicule se révèle être formée par quelques assises de cellules conjonctives, les tubules mésonephrétiques se trouvant disséminés au centre de

l'explant. Dans les autres cas, la structure est compacte. On peut observer des mitoses. Sur 81 cultures, 6 seulement ont échoué (7 %) (fig. 4).

Gonades. — Sur 44 gonades cultivées, 3 se sont nécrosées (7 %). Les autres ont très bien survécu et ont continué à effectuer leur différenciation, comme l'ont décrit ET. WOLFF et K. HAFEN, en 1951. On observe de nombreuses spermatogonies et ovogonies et les mitoses sont fréquentes (fig. 5).

Intestin et cæcum. — Des fragments d'intestin et de cæcum survivent très bien. On voit persister les mouvements péristaltiques, même après 7 à 10 jours de culture. Les mitoses, aussi bien dans l'épithélium interne que dans les couches musculaires, sont fréquentes. L'examen histologique montre que toutes les parties sont saines. Il arrive toutefois que certains explants (14 %) présentent une légère nécrose périphérique, le plus souvent limitée à la séreuse et à une certaine longueur de l'organe. Sur 102 cultures, 2 cas de nécrose complète seulement ont été observés (fig. 6).

Aux extrémités, on note parfois que l'épithélium interne a tendance à se dévagner et à former une sorte de vésicule. Ce fait avait déjà été observé par A. FISCHER (1922) et O. KAPEL (1929). De plus, ces auteurs ont fait remarquer la présence constante de cellules nécrotiques dégénérées qui sont expulsées par l'épithélium. Très fréquemment, nous avons constaté un phénomène analogue; sur certaines coupes, la lumière intestinale est presque complètement obturée par ces débris cellulaires.

Poumon. — Des fragments de poumon (71 explants) se cultivent facilement. Vu la grande abondance d'éléments conjonctifs, la cicatrisation est très rapide; par ailleurs, la présence de nombreux tubules bronchiques permet à toutes les cellules de se trouver dans de bonnes conditions de respiration. Il arrive cependant que les cellules de l'épithélium se nécrosent après 4 à 5 jours de culture; l'explant prend alors un aspect blanchâtre et laiteux. Les fragments manifestent une tendance très nette à s'étaler, et l'épithélium bronchique peut varier d'un épithélium pluristratifié à un épithélium unistratifié, observations qui avaient déjà été faites par L. VAKAET, en 1956 (fig. 7).

FIG. 1. — Association de deux explants de foie sur milieu standard. Première phase : les explants sont encore séparés. (Gr. : $\times 180$.)

FIG. 2. — Association de deux explants de foie sur milieu standard. Deuxième phase : confluence des éléments de la périphérie. (Gr. : $\times 180$.)

FIG. 3. — Association de deux explants de foie sur milieu standard. Troisième phase : fusion complète. (Gr. : $\times 160$.)



FIG.
1.



FIG.
2.

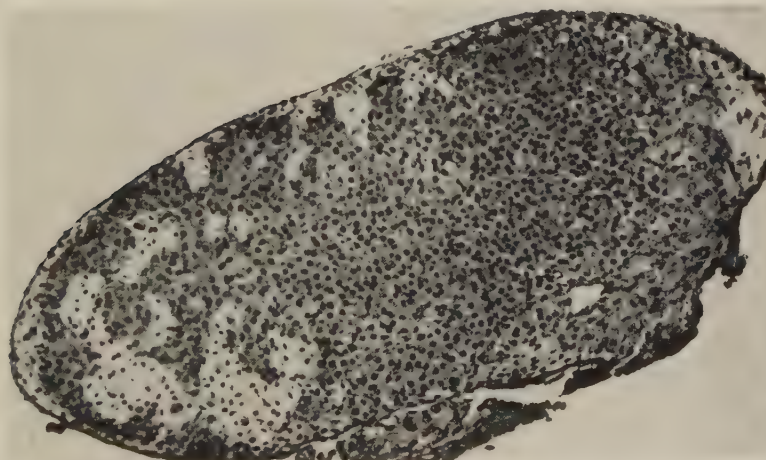


FIG. 3.

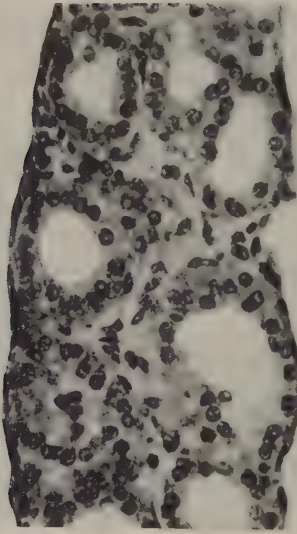
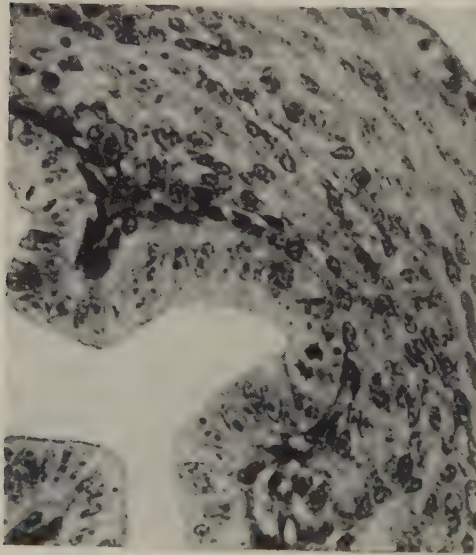
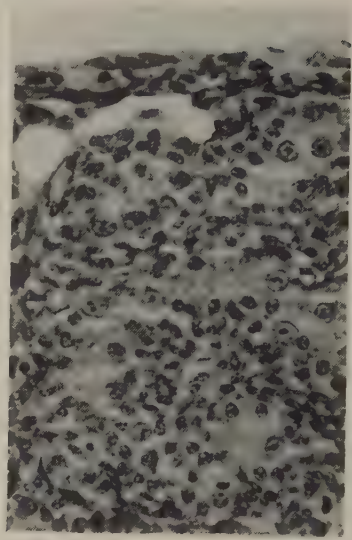
FIG.
4.FIG.
5.

FIG. 6.



FIG. 7.

FIG. 4. — Explant de mésonephros cultivé sur milieu standard pendant 6 jours. (Gr. : $\times 400$.)

FIG. 5. — Testicule cultivé sur milieu standard pendant 7 jours. (Gr. : $\times 400$.)

FIG. 6. — Intestin cultivé sur milieu standard pendant 6 jours 1/2. (Gr. : $\times 480$.)

FIG. 7. — Poumon cultivé sur milieu standard pendant 5 jours. (Gr. : $\times 105$.)

B. — CULTURES SUR MILIEU T
(A BASE DE LIQUIDE DE TYRODE SEULEMENT)

Sur un tel milieu, la nécrose est le plus souvent totale au bout de 48 heures. Dans le cas d'organes entiers, tels des fragments d'intestin ou des gonades, qui n'ont pas été trop lésés à l'explantation, la survie peut aller jusqu'à 4 ou 5 jours. Sur un total de 46 cultures, comprenant 24 explants de foie, 12 fragments d'intestin et 10 explants de mésonéphros, 35 (76 %) se sont nécrosées avant le 4^e jour de culture.

De plus, jamais une fusion intime n'a pu être observée : deux explants associés s'accolent, mais il n'y a pas interpénétration des tissus, et la ligne de suture reste visible.

Ces observations confirment les résultats obtenus par ET. WOLFF (1953) sur des cultures d'organes variés des embryons de Poulets et de mammifères.

C. — CULTURES SUR MILIEUX A BASE D'EXTRAIT DE FOIE (F)

1^o *Extrait de foie de 9 jours.*

Foie. — Sur tous les explants de foie cultivés, 18 % seulement ont survécu pendant plus de 5 jours. Il faut noter que les résultats ont été légèrement différents dans deux séries d'expériences, s'échelonnant chacune sur une vingtaine de séries de cultures.

Dans un premier travail, nous avons montré, avec J. DEMAL (1955), que, sur 113 explants de foie, 5 % seulement échappaient à la nécrose totale après 5 jours de culture. Entre 40 et 60 heures de culture, on a pu voir se former autour des explants une collerette blanche de cellules nécrosées. Cette nécrose périphérique a gagné progressivement le centre pour être totale après 5 jours de culture (fig. 8 et 9).

Dans une deuxième série d'expériences, les résultats ont été plus variables. 98 explants de foie ont été mis en culture. Dans un tiers environ des cas (32 %), les explants paraissent se comporter comme sur standard; ils homogénéisent leurs contours et semblent être en bonne survie après 5 jours. Dans le cas d'explants qui se nécrosent, le phénomène n'a souvent rien de comparable à ce que l'on avait pu observer dans la première série. Il n'y a pas apparition d'une collerette de cellules nécrosées autour du fragment, mais il se produit comme une sorte de lyse de l'organe, qui semble fondre sur le substrat.

L'histologie a montré que sur les 32 explants survivants, 18 présentaient de beaux noyaux à nucléoles fortement colorés, même après 7 jours de culture, tandis que 14 avaient des noyaux petits et anguleux, la cica-

trisation n'étant pas nette. A ceci s'ajoute l'observation que les associations ne sont jamais très intimes. Il y a fort accolement, mais pas inter-pénétration, et on peut toujours distinguer les limites des explants mis en présence.

L'échec des tentatives de culture de foie sur son propre extrait était assez inattendu. Aussi, la première idée fut-elle de contrôler si nous nous trouvions en présence d'un effet spécifique. C'est alors que nous avons entrepris la culture d'autres organes.

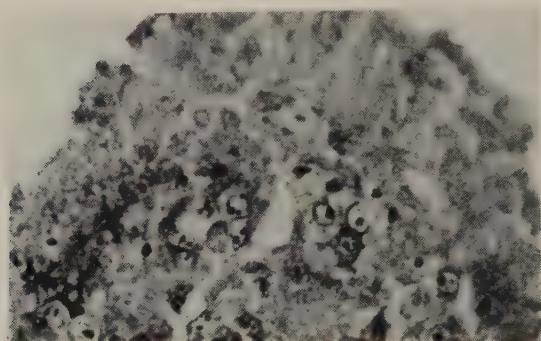


FIG. 8.

Foie cultivé sur extrait de foie de 9 jours seul pendant 5 jours. Complètement nécrosé. (Gr. : $\times 480$.)



FIG. 9.

Deux explants de foie associés sur un milieu à base d'extrait de foie de 9 jours seul. Pas d'homogénéisation, pas d'association, nécrose complète après 5 jours. (Gr. : $\times 165$.)

Mésonephros. — Sur 74 cultures, 29 survivent (39 %). Les autres se nécrosent et présentent un aspect granuleux, réticulé. Les noyaux sont petits et l'ensemble désorganisé ou kystique.

Gonades. — Sur 36 gonades explantées, 18 ont survécu (50 %). Mais au contact du milieu les contours sont souvent irréguliers, et il y a dispersion cellulaire. Autour des ovaires le cortex est plus ou moins bien développé. Les 18 organes restants sont fortement ou complètement nécrosés.

Intestins et cæcums. — Sur 52 fragments, 5 seulement survivent pendant plus de 5 jours. Les autres sont fortement nécrosés à la périphérie, la nécrose allant souvent jusqu'à l'épithélium interne qui, dans la majorité des cas, reste intact.

Poumon. — Sur 33 explants, 12 survivent (36 %). Les autres sont généralement complètement nécrosés et, après 5 jours de culture, il ne reste plus qu'une pâte visqueuse, dans laquelle on ne reconnaît plus aucune structure.

L'on pouvait se demander si cette dégénérescence des organes était due à une déficience alimentaire, consécutive à la suppression du jus d'embryons, ou à un phénomène de toxicité de l'extrait de foie. La similitude de l'évolution des organes sur milieux T et F nous faisait penser à une insuffisance de l'extrait de foie; ainsi les explants étaient voués à la mort par inanition. Mais l'idée de toxicité n'était pas exclue. En vue de contrôler cette possibilité, nous avons utilisé des milieux dans lesquels nous avons remplacé le Tyrode du milieu standard ou d'un autre milieu efficace (à base d'extrait d'intestins, de peau...) par de l'extrait de foie (milieu TF), et nous avons observé que ces milieux permettaient la survie tout comme le milieu standard.

2° Cultures sur milieu TF (jus d'embryons + extrait de foie).

Foie. — Sur 109 explants, 21 % seulement ont présenté de la nécrose périphérique, ou se sont complètement nécrosés. Dans 11 % des cas les noyaux étaient petits et tassés et les fragments ne s'étaient pas homogénéisés. On voit que ces résultats sont tout à fait comparables à ceux que nous avons obtenus sur milieu standard (fig. 10).

Mésonéphros. — Sur les 25 explants cultivés, 2 se nécrosent dès le départ. Les autres (92 %) évoluent normalement, présentant soit une structure massive, soit une structure vésiculeuse, comme sur milieu standard.

Intestins. — 2 explants sur 42 sont nécrosés après 5 jours. Généralement les mouvements péristaltiques continuent à se manifester, même au-delà de 6 à 7 jours de culture.

Gonades. — Les gonades évoluent comme sur milieu standard avec un taux de 90 % de bonnes survies.

Poumon. — Sur les 6 fragments cultivés, 2 se sont nécrosés.

Si nous établissons le pourcentage total des cultures qui ont évolué normalement, nous avons 82 % contre 86 % sur milieu standard. On voit que cette différence n'est pas significative.

Ce résultat éliminait l'idée de toxicité de l'extrait de foie. Remarquons par ailleurs que, si sur le milieu T la nécrose d'explants fragiles comme le foie est totale après 48 heures, elle ne l'est qu'après 5 jours sur le milieu F, le début de sa manifestation se situant entre 40 et 60 heures de culture; il est vraisemblable qu'une action toxique éventuelle se serait manifestée dès le départ de la culture.

A ceci s'ajoute l'observation qu'il suffit de combiner l'extrait de foie avec une solution de cystéine à 3 % pour élever le taux de bonnes survies de 29 à 66 %. En effet, sur 59 organes cultivés, 39 ont bien survécu.

Il doit donc y avoir dans l'extrait de foie des substances qui, tout en permettant la survie pendant quelque temps, ne suffisent pas à l'entretenir.

Nous nous sommes demandé alors si l'extrait de foie âgé ne serait pas plus efficace que l'extrait de foie de 9 jours.

3° Cultures sur extrait de foie de 17 jours.

Foie. — 50 % des explants se sont complètement nécrosés. Dans les cas favorables, les explants ont pu être maintenus en survie pendant 6 à 7 jours. Il faut noter cependant l'absence de mouvements de rétrécissement. Les fragments restent plats, tels qu'à l'explantation. Il n'y a qu'une légère homogénéisation des contours. Deux explants associés s'accolent, se fusionnent, mais l'ensemble reste plat. Parfois on observe entre deux explants voisins la formation d'une zone de raccordement très mince, comprenant trois à quatre assises de cellules et donnant à l'ensemble un aspect étoilé. Généralement les explants sont très adhérents au milieu.

L'étude histologique a montré que la participation des éléments conjonctifs à la cicatrisation est plutôt rare. Le plus souvent les cellules hépatiques sont en contact direct avec le milieu, sans alternance avec des cellules conjonctives. Les explants envoient des « crampons adhésifs » dans le substrat, ce qui explique leur forte adhérence. Dans ces crampons, les cellules ont un cytoplasme réfringent et un noyau volumineux. Il en est de même des cellules directement en contact avec le milieu. Les noyaux du centre sont souvent petits. Cependant il y a des explants en aussi bon état que sur le milieu standard. Les mitoses ne sont pas très fréquentes, mais on peut en observer sporadiquement dans les crampons et dans les couches cellulaires près du substrat (fig. 11).

Gonades. — Sur 20 gonades cultivées, 8 survivent (40 %). Les autres se nécrosent et sont parfois presque complètement dégénérées.

Intestin. — Sur 61 explants, 26 survivent (42 %). Les 35 organes restants subissent la nécrose allant de la périphérie vers le centre comme sur extrait de foie de 9 jours.

Il faut noter que l'on observe souvent la formation d'une pellicule de lipides à la surface du milieu. Aussi peut-on penser que les échecs de cultures sont dus à la présence de cette pellicule, et que la culture d'organes doit être possible d'une façon générale sur l'extrait de foie âgé. Néanmoins, on peut penser aussi que les foies destinés à être broyés ont été plus ou moins bien débarrassés de leur contenu en plasma sanguin. Dans ce dernier cas, les réussites seraient attribuées à la présence de plasma, et l'extrait de foie âgé ne serait pas plus favorable que l'extrait

FIG. 10.

Foie cultivé sur milieu TF
pendant 5 jours. (Gr. :
× 720.)

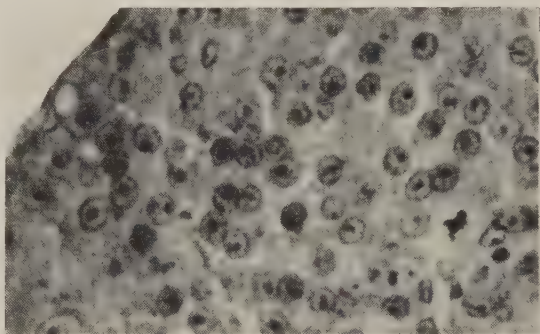
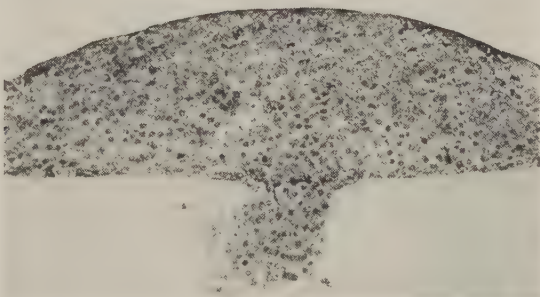


FIG. 11.

Foie cultivé sur extrait de
foie de 17 jours seul
pendant 5 jours. (Gr. :
× 225.)



de foie de 9 jours. Cependant, si nous lavons les organes dans du Tyrode avant de faire l'extrait, les résultats sont identiques.

Quoi qu'il en soit, l'extrait de foie de 17 jours, bien que loin d'être aussi efficace que l'extrait d'embryons, s'est révélé plus favorable que l'extrait de 9 jours. Surajouté au jus d'embryons, il ne s'est pas montré toxique.

De nombreux travaux ont déjà été consacrés à l'action de l'extrait de foie en culture de tissus. Mais les résultats sont assez divergents et même contradictoires. WALTON (1914) montre que l'extrait de foie de lapin adulte inhibe fortement la croissance et du tissu connectif et des cel-

lules parenchymateuses de tous les tissus. HEATON (1926, cité par MEDAWAR) démontre la présence dans l'extrait de foie adulte d'un facteur inhibant la croissance des fibroblastes du cœur, mais indifférent à un grand nombre d'épithéliums. BRUES, JACKSON et AUB (1936 et 1940) trouvent que la croissance des fibroblastes est inhibée dans la proportion de 75 à 85 % par l'extrait de foie dilué dans deux fois son volume de Tyrode. D'après ces auteurs, l'inhibiteur n'est pas présent dans l'extrait de foie embryonnaire de Poulet avant le 15^e jour d'incubation. Aucune nécrose n'est constatée. Les cultures sont simplement inhibées, et reprennent leur croissance normale si elles sont retransplantées sur un milieu efficace. TROWELL et WILLMER (1939) constatent que l'extrait de foie de Poulet adulte de 3 mois n'a aucun effet significatif sur les cultures, alors que d'autres extraits d'organes, comme les extraits de cerveau, de thyroïde, de thymus et de gonades ont un effet de stimulation assez marqué.

MORGAN, CAMPBELL et MORTON (1955), au contraire, montrent que l'extrait de foie a un effet très marqué sur la prolongation de la survie des fibroblastes du cœur, même à des concentrations très faibles, de l'ordre de 0,00001. DOLJANSKI, HOFFMANN et TENENBAUM, dans un travail paru en 1936, étudient les propriétés de divers extraits d'organes, et trouvent que l'extrait de foie occupe une place à part. Après une période d'activation de la croissance de colonies de fibroblastes, les auteurs constatent que cette stimulation du début est régulièrement suivie d'un ralentissement important du taux de la croissance entre les 3^e et 4^e jours de culture. Ils en concluent que l'action de l'extrait de foie est double : il y a une action de stimulation franche suivie d'une action inhibitrice conduisant à la dégénérescence des cellules de la colonie.

Mais si tous les auteurs ont étudié les propriétés de l'extrait de foie, soit en combinaison avec du plasma, soit avec des solutions d'acides aminés, aucun travail, à notre connaissance, n'a fait mention des propriétés de l'extrait de foie employé à lui seul, ni en culture d'organes. De plus, il était difficile de savoir si l'extrait était vraiment inhibiteur, ou si le milieu était simplement défavorable à la croissance *in vitro*.

D'après nos résultats, l'extrait de foie seul ne suffit pas à subvenir aux besoins nutritifs d'organes cultivés *in vitro*. Ajouté au milieu standard, il n'inhibe pas les cultures qui évoluent exactement comme sur milieu standard. Une stimulation éventuelle n'a pas pu être démontrée jusqu'ici, les critères employés, survie et fusion des organes, n'ayant pas permis d'apprécier de différence. De plus, aucune action sélective n'a été notée. Les organes sont atteints suivant un degré de sensibilité qui est le même vis-à-vis du milieu standard et de tout autre milieu. Ainsi l'intestin, le poumon et le foie sont très sensibles, et le pourcentage de survie est toujours inférieur à celui obtenu dans les mêmes conditions pour les gonades et le mésonéphros, beaucoup moins sensibles.

En résumé, afin de donner un aperçu général des différents résultats énoncés jusqu'ici, établissons le pourcentage total de survies prolongées sur les différents milieux éprouvés :

Milieu standard	86 %
Standard + extrait de foie	82 %
Extrait de foie de 17 jours	44 %
Extrait de foie de 9 jours	29 %
Milieu témoin T	24 %

TABLEAU IX

COMPARAISON DES RÉSULTATS OBTENUS
SUR LES MILIEUX : STANDARD, TF, EXTRAITS DE FOIE DE 9 ET 17 JOURS

Nature de l'explant	Milieu standard		Milieu TF		Milieu extrait foie 9 jours		Milieu extrait foie 17 jours	
	Nombre d'ex- plants	% de bonnes survies	Nombre d'ex- plants	% de bonnes survies	Nombre d'ex- plants	% de bonnes survies	Nombre d'ex- plants	% de bonnes survies
Foie	163	72	109	68	211	18	98	50
Mésonephros ..	81	93	25	92	74	39	—	—
Gonades	44	93	20	90	36	50	20	40
Intestin	102	85	42	96	52	10	61	42

4° ACTION D'AUTRES EXTRAITS D'ORGANE EN CULTURE

Partant de l'observation que l'extrait de foie, tout en permettant une certaine survie aux organes cultivés *in vitro*, ne suffisait pas à couvrir intégralement leurs besoins nutritifs, nous nous sommes demandé si d'autres extraits d'organes ne seraient pas plus efficaces, et plus particulièrement si un organe, autre que le foie, ne pourrait être maintenu en survie sur son propre extrait.

Dans un premier travail, nous avons cherché à déterminer l'efficacité d'extraits préparés à partir de différentes régions de l'embryon de Poulet, et à étudier leurs propriétés vis-à-vis d'explants de foie cultivés *in vitro*. Un tel essai avait été fait par O. FOWLER, en 1937, sur des cultures de fibroblastes de cœurs d'embryons de Poulet de 8 jours; mais, à part le fait que la région antérieure était légèrement plus efficace, aucun résultat significatif n'avait été obtenu.

Dans nos expériences, nous avons observé que des explants de foie, cultivés sur jus de tête, jus de tronc (musculature et squelette), jus de viscères sans le foie (poumons, cœurs, intestins, rates et reins), et jus de viscères avec foie, se comportent comme sur milieu standard. La cicatri-

sation est très rapide; les explants arrondissent leurs angles et peuvent être maintenus en survie pendant assez longtemps.

Outre ces différents extraits, résultant du broyage de complexes d'organes et dont il n'était pas interdit d'espérer qu'ils contiendraient encore tous les principes nutritifs nécessaires à la survie *in vitro*, nous avons essayé quelques extraits préparés à partir d'un seul organe. Tandis que l'extrait de cerveau s'est révélé être aussi efficace que l'extrait total d'embryons, l'extrait de cœurs de 9 jours n'a jamais permis la survie au-delà de 60 heures (tableau X).

L'action d'autres extraits sera examinée ultérieurement.

TABLEAU X
CULTURES D'EXPLANTS DE FOIE SUR DIFFÉRENTS MILIEUX

Milieus éprouvés	Nombre d'explants	Survie	Propriété de fusion
Standard	84	10-15 jours sans repiquage.	+++
Jus de tête	42		
Jus de tronc	44		
Jus de viscères	53		
Jus de cerveau	16		
Jus de cœur 9 jours	41	2-3 jours maximum.	0

A la suite de l'échec de culture d'explants de foie sur extrait de cœur de 9 jours, l'on pouvait se demander si cette insuffisance était générale pour la culture d'autres organes, et si l'extrait de cœur de 17 jours n'était pas plus favorable à la culture d'organes *in vitro*.

1° Cultures sur extrait de cœur de 9 jours.

Foie. — Sur 41 explants, 7 seulement survivent (17 %). A l'histologie, ces explants présentent de beaux noyaux, à gros nucléoles, mais les contours sont irréguliers. Les associations sont très lâches; il n'y a qu'un léger accollement des partenaires.

Mésonéphros. — 17 explants sur 25 survivent (68 %). Les autres sont kystiques et présentent des noyaux en dégénérescence.

Gonades. — 19 organes (57 %) survivent sur 33.

Intestin et cæcum. — 2 explants sur 19 seulement ont survécu. Les mouvements péristaltiques se manifestent pendant 24 heures environ, après quoi on voit s'installer la nécrose périphérique qui va s'étendre progressivement jusqu'à l'épithélium interne. Quelquefois la nécrose est complète.

Les 3 fragments de poumon se sont complètement nécrosés.

2° Cultures sur extrait de cœur de 17 jours.

Foie. — Sur 31 explants, 16 se sont complètement nécrosés, 5 sont presque complètement nécrosés, et 3 montrent des noyaux petits et anguleux. Les 7 explants restants se sont comportés comme sur milieu standard. Généralement l'apparition des premiers symptômes de la dégénérescence est retardée, et l'association des organes plus avancée que sur extrait de cœur de 9 jours.

Gonades. — Les 9 organes cultivés ont pu être maintenus en survie pendant plus de 5 jours. Cependant 3 ont manifesté une légère pycnose latérale.

Intestin. — Sur 17 explants, 7 sont complètement nécrosés, et 1 montre de la nécrose périphérique après 5 jours. Les 9 autres sont maintenus en survie pendant 10 jours et continuent leurs mouvements péristaltiques pendant toute la durée de la culture.

De même que dans le cas des extraits de foie, l'extrait de cœur âgé est plus efficace que l'extrait de cœur jeune.

Dans une deuxième série de travaux, nous avons essayé de savoir si, d'une façon générale, un extrait d'organe permet la survie, en culture, de l'organe homologue. Nous nous sommes adressé au mésonéphros, au poumon, à l'intestin et à la peau de l'embryon de Poulet, et nous avons cultivé ces organes, toujours selon la même méthode, sur leurs extraits respectifs. Outre l'organe homologue, nous avons explanté dans chaque série d'autres organes, afin de pouvoir apprécier avec plus de certitude la valeur nutritive des extraits, et de déceler plus rapidement d'éventuelles actions spécifiques.

A. — CULTURES SUR EXTRAIT DE MÉSONÉPHROS

Les extraits ont été préparés à partir du mésonéphros d'embryons de Poulet de 9 jours broyés dans un mortier avec du sable stérile et la quantité nécessaire de solution physiologique de Tyrode. La composition des milieux de culture est celle du milieu standard dans lequel le jus d'embryons a été remplacé par de l'extrait de mésonéphros. Le nombre des explants étudiés se trouve tableau XI.

Mésonéphros. — Sur 54 cultures, 6 seulement ont échoué. 88 % des explants ont évolué comme sur milieu standard. Les associations sont généralement bonnes, et on peut observer des mitoses.

Foie. — 31 explants sur 50 évoluent normalement, homogénéisent rapidement leurs contours, et présentent un aspect histologique sain.

16 manifestent de la nécrose périphérique, et 6 révèlent à l'histologie la présence de noyaux plus petits et anguleux. Si l'on fragmente les explants, la réassociation est très rapide.

Gonades. — Nous avons constaté un seul cas de nécrose sur 17 organes cultivés.

Intestin. — Dans 4 explants, la séreuse et une partie des couches musculaires sont légèrement pycnotiques par endroits et aux extrémités des fragments. Généralement les mouvements péristaltiques continuent à se manifester pendant la durée de la culture.

Poumons. — Sur 15 explants, 1 est complètement lysé comme sur extrait de foie de 9 jours; dans 5 cas, nous avons constaté la dispersion des éléments mésenchymateux, de telle sorte qu'il ne reste plus que les tubules bronchiques qui ont alors tendance à former des vésicules plus ou moins dilatées. Les autres explants ont évolué comme sur milieu standard, les tubules bronchiques étant enrobés dans un mésenchyme abondant.

Sur un total de 137 cultures nous avons 80 % d'évolutions normales, et nous pouvons considérer que l'extrait de mésonéphros permet la survie des organes tout comme le milieu standard (tableau XI).

TABLEAU XI

Explants	Nombre	% de bonnes survies	Comparaison standard
		%	%
Mésonéphros	54	88	93
Foie	50	65	72
Gonades	17	94	93
Intestin	16	75	85

B. — CULTURES SUR EXTRAIT D'INTESTIN

Les extraits ont été préparés avec l'intestin d'embryons de 9, 11 et 12 jours. Les fragments explantés ont été prélevés sur des embryons de 9 jours, sauf l'intestin qui a été pris sur des embryons de 10 et 11 jours le plus souvent. Le nombre des explants utilisés se trouve tableau XII.

Intestin. — 4 cultures sur 41 se sont nécrosées. Dans tous les cas, les mouvements péristaltiques ont été perceptibles après 5 jours de culture. Dans deux fragments, l'épithélium interne s'est distendu en comprimant les couches musculaires, de telle sorte que l'ensemble formait une vésicule allongée et transparente.

Foie. — Sur 55 cultures, 36 évoluent normalement, 10 sont complètement nécrosées après 5 jours, 5 fragments sont restés plats et l'on a pu voir se former une membrane étoilée comme sur extrait de foie de 17 jours.

Mésonéphros. — 5 explants se sont nécrosés et 4 présentaient un peu de nécrose diffuse par endroits. Les autres ont évolué comme sur milieu standard. Les fragments sont toujours moins homogènes que les explants de foie, mais ce résultat s'étend à la culture sur tous les milieux.

Gonades. — 1 seul cas de nécrose a été observé. Deux organes ont été stériles et légèrement vacuolaires.

Poumon. — Sur 20 fragments, 5 ont manifesté la tendance à la dispersion du mésenchyme. Les 15 explants restants ont évolué comme sur milieu standard.

TABLEAU XII

Explants	Nombre	% de survies prolongées	Comparaison standard
		%	%
Intestin	41	90	85
Foie	55	72	72
Mésonéphros	26	80	93
Gonades	23	95	93

Le pourcentage total de bonnes cultures est de 84 %, contre 86 % sur milieu standard; l'extrait d'intestin apparaît aussi efficace que l'extrait total d'embryons.

C. — CULTURES SUR EXTRAIT DE PEAU

Les extraits de peau utilisés ont été préparés à partir d'embryons de 9 à 13 jours d'incubation.

Cultures de fragments de peau. — Les fragments destinés à être cultivés ont été prélevés sur des embryons de 6 1/2 à 7 jours d'incubation. A ce stade, la peau est lisse et ne présente pas encore de germes plumaires (fig. 12).

— Transplantés sur milieu standard, les fragments survivent très bien, et effectuent la différenciation de leurs germes plumaires. Selon les expériences de PH. SENDEL (1957), les ébauches dermiques existant au moment de l'explantation disparaissent complètement au bout de quelques

heures de culture. Après 24 à 48 heures, de nouvelles ébauches apparaissent et induisent l'épiderme à pousser des germes plumaires.

Sur 36 fragments que nous avons cultivés, 2 seulement se sont nécrosés (5 %). Les autres se sont différenciés normalement.

— Sur extrait de peau, 4 cultures sur 43 ont échoué (9 %). Les explants se sont comportés comme sur le milieu standard : ils ont effectué leur

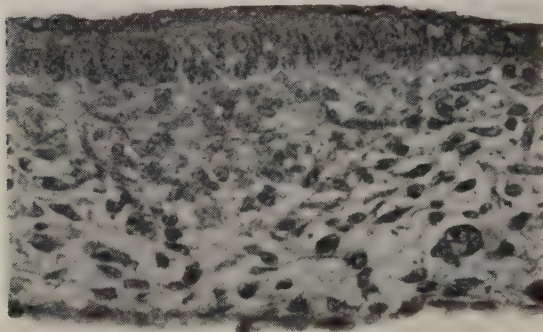


FIG. 12.

Peau de 6 jours 3/4 non cultivée. Noter l'absence de germes plumaires (Gr. : $\times 410$.)

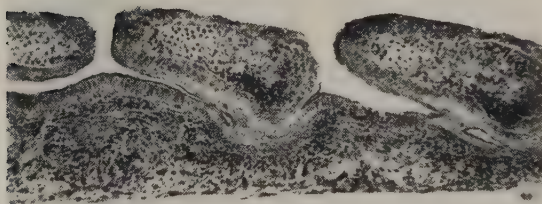


FIG. 13.

Peau cultivée sur extrait de peau pendant 5 jours. Différenciation des germes plumaires. (Gr. : $\times 105$.)

différenciation et ont survécu pendant plus de 5 jours (fig. 13). Tous les autres organes cultivés sur extrait de peau ont évolué normalement, comme le montre le tableau XIII.

TABLEAU XIII

Explants	Nombre	% de survies prolongées	Comparaison standard
		%	%
Foie	32	64	72
Intestin	15	74	85
Mésonéphros	24	100	93
Gonades	14	93	93

D. — CULTURES SUR EXTRAIT DE POUMON

Les extraits ont été préparés avec des poumons prélevés sur des embryons de 9 à 13 jours d'incubation.

Nous avons cultivé 88 fragments de poumon provenant d'embryons de 9 jours. Les explants manifestent toujours une plus grande tendance

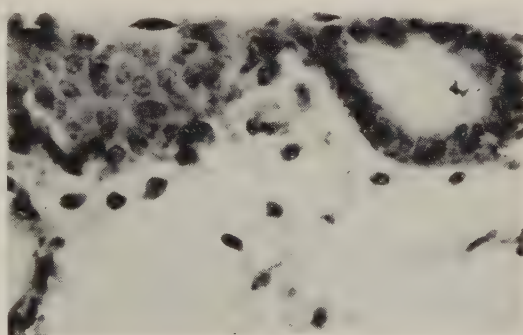
FIG. 14.

Poumon cultivé sur extrait de poumon pendant 5 jours. Noter la dilatation des tubules et la dispersion du mésenchyme. (Gr. : $\times 105$.)



FIG. 15.

Poumon cultivé sur extrait de poumon pendant 5 jours (Gr. : $\times 512$.)



à s'étaler que sur milieu standard. Le mésenchyme tend à se disperser et les tubules se rangent de préférence à l'extérieur et forment de grosses vésicules. A l'histologie, ces caractères sont moins évidents. Il reste souvent du mésenchyme au centre de l'explant. Mais, le plus souvent, les tubules sont dépourvus de gaine mésenchymateuse sur le pourtour de l'explant (fig. 14 et 15).

Tous les autres organes cultivés sur extrait de poumon se sont comportés comme sur milieu standard (tableau XIV).

TABLEAU XIV

Explants	Nombre	% de survies prolongées	Comparaison standard
		%	%
Foie	35	74	72
Mésonephros	22	81	93
Intestin	28	93	85
Gonades	13	85	93

TABLEAU XV

RÉCAPITULATION DES RÉSULTATS OBTENUS SUR LES DIFFÉRENTS MILIEUX

Nature du milieu	Nombre total d'explants cultivés	% moyen de survies prolongées	Propriété d'association
		%	
Standard	390	86	+++
Standard + foie	196	82	+++
Intestins	145	84	+++
Peau	85	83	+++
Poumon	98	83	+++
Mésonephros	137	80	+++
Cœur 17 jours	57	50	++
Foie 17 jours	179	44	++
Cœur 9 jours	118	38	0
Foie 9 jours	373	29	+
Tyrode	46	24	±

N. B. — Ne sont consignés dans ce tableau que les résultats relatifs au groupe d'organes cultivés sur tous les milieux, à savoir : foie, mésonephros, intestin et gonades.

5° DIFFÉRENCIATION D'UN ORGANE EN PRÉSENCE DE SON PROPRE EXTRAIT

Le concept du contrôle organe-spécifique de la croissance émis par P. WEISS (1947) laisse penser que la présence d'un extrait d'organe inhibe la différenciation de l'organe homologue.

Dans une première confirmation de cette hypothèse, WEISS (1952) rapporte que :

1° Sur 333 cultures de cœur sur extrait total d'embryons, 2 seulement battent après 4 jours.

Sur 349 cultures sur extrait embryonnaire sans le cœur, 129 battent après 4 jours.

2° Sur 1 007 explants de métanéphros sur extrait total, 74 différencient des tubules.

Sur 1 006 explants de métanéphros sur extrait sans métanéphros, 176 différencient des tubules.

En 1952, S. M. ROSE trouve que la différenciation des tissus de la grenouille (sang, cerveau et cœur) est supprimée si l'on cultive les embryons sur extrait homologue à l'organe ou au tissu en cause.

D'après ces résultats, EBERT et TOLMAN (cités par EBERT, 1955) attendaient que des greffes de rate, faites à des embryons de Poulet avant le quatrième jour, supprimeraient le développement de la rate. En vue d'analyser cette éventualité, les auteurs ont fait des greffes coelomiques de rate et des injections d'extrait de rate dans le coelome. Mais ils n'ont observé aucune différence avec les témoins.

Les résultats exposés au début de ce travail montrent que le développement des organes n'est pas affecté par l'injection, au troisième jour, de l'extrait correspondant. On peut objecter que les substances, déposées sur l'aire vasculaire, arrivent trop tard dans l'organisme. Mais J. M. KIRRMANN (1955), dans une étude sur l'influence protectrice de la cystéamine contre l'action tératogène des rayons X, a montré qu'il suffit de pratiquer l'injection 4 heures avant l'irradiation, pour obtenir la protection. Donc, même s'il s'agit de molécules plus grandes, on peut admettre que les substances sont absorbées dans les 24 heures qui suivent l'injection. On peut toutefois invoquer le fait qu'elles n'arrivent pas sur place telles quelles, mais que, véhiculées par le courant sanguin, elles subissent des transformations variées.

Aussi dans cette étude, la méthode de culture, permettant le contact direct entre l'organe et l'extrait, nous fut d'un grand secours.

Les expériences de culture d'organes sur extrait homologue, relatées jusqu'ici, ne nous fournissent pas, la peau mise à part, de données valables, concernant la différenciation. Tous les organes (foie, mésonéphros, poumon et intestin), cultivés sur leur propre extrait, sont déjà différenciés au moment de l'explantation, faite de façon générale au neuvième jour.

La peau cependant, prélevée entre 6 1/2 et 7 jours d'incubation, stade auquel, d'après les études de PH. SENDEL (1957), elle ne présente encore que quelques ébauches dermiques, se différencie très bien sur son propre extrait. Sur 43 explants cultivés, 39 ont effectué la différenciation de leurs germes plumaires et ont survécu pendant plus de 5 jours.

Cette constatation nous a incité à reprendre quelques expériences complémentaires dans cette direction.

Nous nous sommes adressé au très jeune embryon de Poulet, entre 22 et 30 somites. A ce stade, ni le système musculaire, ni le cartilage ne sont différenciés. Par des incisions, pratiquées latéralement le long de la ligne somitique, nous avons prélevé l'ensemble moelle-chorde et somites. Les fragments cultivés comprenaient un minimum de 6 somites.

Cultivé sur milieu standard, un tel ensemble survit très bien. Après 24 à 48 heures, on voit apparaître des contractions rythmiques qui témoignent de la mise en place, dans l'explant, d'un système musculaire

fonctionnel. Des coupes faites à ce stade montrent en effet des paquets de fibres musculaires, dans les parties latérales, de part et d'autre du système axial de l'explant. Ces paquets peuvent, suivant le cas, être scindés en 2 ou plusieurs masses. Le reste du matériel somitique est formé de mésenchyme lâche et indifférencié (fig. 16 et 17).

Entre 4 et 7 jours de culture, on voit s'organiser autour de la chorde, un manchon dense de cellules, vraisemblablement les cellules du sclérotome, représenté primitivement par un tissu mésenchymateux lâche situé

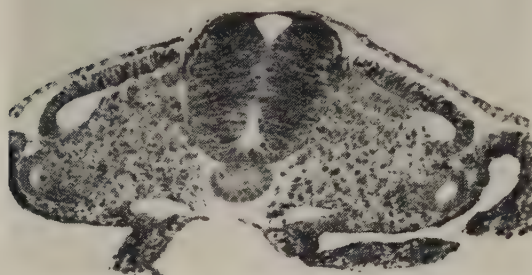


FIG. 16.

Embryon de 28 somites ;
explant non cultivé. (Gr. :
× 115.)

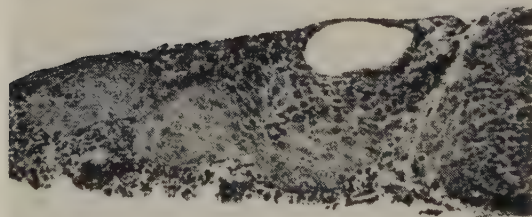


FIG. 17.

Explant prélevé sur un em-
bryon de 28 somites et
cultivé pendant 3 jours.
Noter les 3 paquets de
fibres musculaires. (Gr. :
× 160.)

dans la région médiane du somite. Entre 7 et 9 jours, on voit apparaître la matrice cartilagineuse et, à 9 jours, il y a tout autour de la chorde, et parfois autour d'une partie plus ou moins importante du système nerveux, une gaine de cartilage formée par la substance fondamentale et des éléments figurés : les chondrioblastes (fig. 18 et 19).

Dans quelques cas, il se forme, loin de la moelle et de la chorde, des paquets isolés de cartilage, sans doute par autodifférenciation (tableau XVI).

Que se passe-t-il sur extrait de muscle et de cartilage ?

Nous avons préparé des extraits de muscle et de cartilage à partir du matériel prélevé dans la région thoracique et sur les pattes d'embryons de 11 à 13 jours.

Extrait de muscle. — Sur les 22 explants cultivés, nous avons assisté à l'apparition de contractions rythmiques. L'histologie nous a permis de retrouver les mêmes formations que sur milieu standard, à savoir des paquets de fibres musculaires de part et d'autre de l'explant.

Extrait de cartilage et d'os. — Nous avons explanté 17 fragments sur des milieux à base d'extrait de cartilage pur. Mais l'extrait de cartilage s'est avéré insuffisant; la plupart des explants se sont dispersés et

FIG. 18.

Explant prélevé sur un embryon de 27 somites et cultivé pendant 4 jours. Début de condensation des cellules du sclérotome autour de la chorde. (Gr. : $\times 110$.)

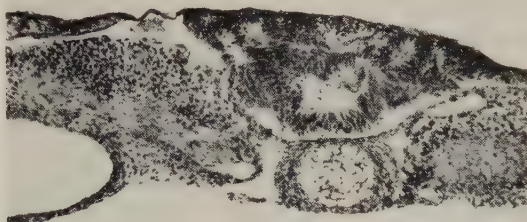


FIG. 19.

Explant prélevé sur un embryon de 27 somites et cultivé pendant 9 jours. Différenciation importante de cartilage. (Gr. : $\times 150$.)

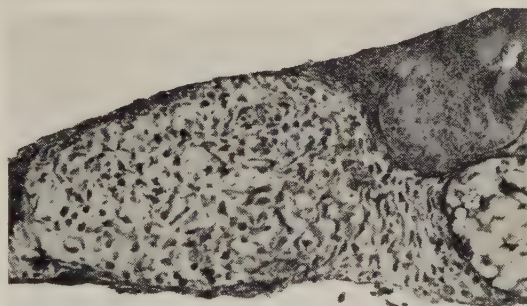


TABLEAU XVI

CULTURES D'EXPLANTS DE MOELLE, CHORDE ET SOMITES SUR MILIEU STANDARD

Série	Nombre d'explants	Durée de culture	Muscles	Cartilage
1.	6	4 jours.	+	0
2.	5	4 jours.	+	Parfois légère organisation autour de la chorde.
3.	2	7 jours.	+	Légère organisation précartilagineuse.
4.	4	7 jours.	+	+
5.	4	9 jours.	+	+++
6.	11	9 jours.	+	+++

nécrosés par la suite. Ce résultat rejoint une constatation de M. KIENY (1957), qui remarqua que des milieux à base d'extrait de tibias n'étaient pas très favorables à la culture d'organes *in vitro*. Dans les 7 cas, cependant, où les explants ont survécu pendant 7 à 9 jours, il s'est formé du cartilage tout comme sur milieu standard.

Dans une autre série, nous avons cultivé 31 explants sur des milieux composés de jus d'embryons et d'extrait de cartilage, dans les proportions de 1/1. Dans tous les cas, il y a eu différenciation de cartilage entre 7 et 9 jours de culture.

Ces résultats montrent que la différenciation de la peau, du système musculaire et du cartilage n'est pas inhibée par la présence de l'extrait homologue.

Reprenant une expérience de PAUL WEISS, nous avons explanté soit des cœurs entiers d'embryons de 2 à 3 jours, soit des fragments de cœurs d'embryons plus âgés, de 4 à 7 jours d'incubation, et nous les avons cultivés en présence d'extrait de cœur.

Sur milieu standard témoin, 64 % des explants battent après 7 jours. Sur milieu standard additionné de 3 gouttes d'extrait de cœur, préparé à partir de cœurs d'embryons de 13 à 15 jours, 26 % seulement des explants battent après 7 jours. Les autres s'arrêtent de battre à partir du deuxième jour de culture et se nécrosent par la suite (tableau XVII).

TABLEAU XVII

CULTURES DE CŒURS

Milieux	Nombre d'explants	Ba tent après 48 heures	Battent après 4 jours	Battent après 7 jours
Standard	102	102	95	66
Standard + cœur	105	81	56	27
Standard (en %).....		100	93	64
Standard + cœur (en %).....		77	53	26

Ce résultat montre qu'il y a, dans l'extrait de cœur, une substance qui inhibe les battements des fragments explantés. Nous ne pouvons conclure à une inhibition de la différenciation ou de la croissance. En culture, les explants de cœurs jeunes s'homogénéisent et s'organisent en une vésicule contractile, mais on ne peut parler de différenciation.

TUMANISHVILI, DZHANDIERI et SVANIDZE (1956) montrent que des injections d'extrait de cœur de Poule à des embryons de 6 à 15 jours, stimulent de façon marquée la croissance du cœur des hôtes. Mais l'effet est transi-

toire et de très courte durée. Après 24 heures, il y a régulation et le cœur reprend sa taille normale. Ce résultat tend à prouver que, dans le cœur, il y a un principe automatique capable de régler la croissance.

L'idée de l'existence d'un principe autorégulateur de la croissance et de la différenciation ne semble pas devoir s'étendre à tous les organes. La régulation de la croissance de la peau, du système musculaire et du cartilage paraît conditionnée par des facteurs extrinsèques. Il en serait de même pour le foie. En effet, le fait que, dans les expériences de TUMANISHVILI, la stimulation de la croissance du foie est plus durable que la stimulation du cœur suggère que la régulation de la croissance du foie ne se fait pas par un facteur contenu dans l'organe lui-même.

IV. — DISCUSSION ET CONCLUSIONS

L'administration par la voie circulatoire d'extraits de foie et de rate à des embryons de Poulet détermine une augmentation de la croissance de l'organe homologue. Cette augmentation est d'autant plus importante que l'extrait est plus âgé.

Les effets observés ne sont cependant pas complètement spécifiques, l'extrait de foie agissant aussi sur la croissance de la rate et vice versa. De plus, ils sont inférieurs à ceux rapportés par la plupart des auteurs. Nous attribuons ce fait aux différences de technique. EBERT montre que des injections d'homogénéisats de rate donnent une stimulation beaucoup plus faible que les greffes; il en déduit qu'un apport constant de matériel est requis, et que la stimulation ne semble pas due à un mécanisme catalytique. De plus, tous les embryons ne réagissent pas, et les substances injectées ne sont pas absorbées intégralement. P. ANCEL (1953) a estimé que la quantité réellement absorbée par l'organisme correspond à 1/20 de la dose totale administrée.

Toutefois, la constance des effets dans plusieurs séries expérimentales nous permet de conclure à une certaine activité stimulatrice des deux extraits étudiés.

Selon EBERT, les effets non spécifiques peuvent être attribués à la présence, dans chaque organe, de groupes de substances communes à d'autres organes. Cette vue est en accord avec les données les plus récentes sur l'antigénicité des extraits d'organes (K. LANDSTEINER, 1945).

Malgré les nombreux travaux, la nature des substances et le mécanisme en cause sont restés longtemps inconnus, et demeurent en partie obscurs. EBERT (1955) démontre que l'apparition du pouvoir stimulant est en corrélation avec l'apparition, dans la rate, de groupes d'antigènes spécifiques. Des greffes marquées au S35 lui ont permis d'affirmer qu'il y a transfert spécifique de la radio-activité du greffon vers l'organe homo-

logue; ce transfert est sélectif et se fait de la rate vers la rate, du rein vers le rein. De plus, par des injections de méthionine marquée, faites en même temps que des greffes non marquées, il prouve que la croissance résulte d'une incorporation sélective dans les protéines de l'organe hôte de composants spécifiques du greffon. Mais quelle est la nature de ces composants ? TUMANISHVILI, DZHANDIERI et SVANIDZE ont montré, à ce sujet, que les propriétés stimulantes de l'extrait de foie et de cœur sont liées à la fraction thermolabile des protéines; en effet, le pouvoir stimulant disparaît si l'on précipite les protéines par chauffage. Ces auteurs pensent que les protéines extraites, ou plus exactement un groupe bien déterminé d'entre elles, agissent directement sur les organes, stimulant leur croissance et leur développement.

L'inefficacité de l'extrait de foie en culture suggérerait plutôt que les substances injectées à l'embryon ne sont pas utilisables telles quelles. Il apparaîtrait plutôt que dans l'embryon elles sont activées par d'autres éléments. Nous avons pensé à une dégradation enzymatique en fractions plus simples qui serviraient de point de départ à de nouvelles synthèses. Mais il ressort des travaux d'EBERT que des injections dans le sac vitellin restent sans action, par suite de la présence d'enzymes.

Quoi qu'il en soit, l'organe utilise les substances qui lui sont offertes et les incorpore dans son équipement protéique. Tout porte à croire que la stimulation de la croissance résulte d'un phénomène d'assimilation par lequel l'organe utilise les substances pour accroître sa propre matière, plutôt que d'un effet catalytique où un petit nombre de molécules suffirait à déclencher des synthèses nouvelles. C'est pourquoi EBERT (1955) a préféré le terme de « *building block* » au concept de « *template* » ou mécanisme catalytique.

L'intérêt des cultures d'organes sur des extraits variés est double : tout d'abord, il s'agit de savoir quels sont dans l'embryon les tissus qui fournissent les principes actifs; d'un autre côté, il était intéressant d'étudier la possibilité de maintenir un organe en survie sur son propre extrait.

De nos résultats il ressort que, les extraits de foie et de cœur mis à part, tous les extraits étudiés se sont avérés aussi efficaces que l'extrait total d'embryon, du moins quant à la survie des organes cultivés. Il serait intéressant de reprendre une telle étude sur des ébauches jeunes afin de pouvoir observer leur différenciation et leur croissance. Dans le cas présent, les organes sont déjà différenciés à l'explantation et nous n'avons pu contrôler si les divers extraits contenaient tous les principes utiles à la différenciation. Par ailleurs, pour les organes que nous avons cultivés, il est difficile d'apprécier le degré de croissance par la simple méthode de l'observation directe. La comparaison des résultats expérimentaux avec ceux obtenus sur milieu T, dépourvu de toute substance nutritive, de même que la présence de mitoses dans les explants cultivés,

sont des indications précieuses, mais ne sauraient donner lieu à la conclusion qu'il y a croissance effective.

Nous pouvons simplement affirmer que les organes profitent des substances nutritives qui leur sont fournies par les extraits incorporés dans le milieu, et il est déjà intéressant de constater que les extraits étudiés permettent la survie de l'organe homologue et d'autres organes.

Notons aussi qu'il n'appartenait pas à ce travail de vérifier la durée maxima de culture possible. A la suite de l'observation que les déviations et anomalies par rapport à l'évolution standard se produisaient avant le cinquième jour, nous avons choisi pour seuil une durée de 5 à 6 jours de culture. Dans la plupart des cas nous n'avons pas dépassé ce stade.

L'efficacité plus grande des extraits de foie et de cœur âgés est en relation avec l'apparition progressive de substances nouvelles au cours de l'ontogenèse.

L'insuffisance de l'extrait de foie en culture nous a tout d'abord fait penser à une toxicité éventuelle. Mais cette idée fut écartée pour 3 raisons:

— il est vraisemblable qu'une action toxique se serait manifestée dès les premières heures de culture;

— ajouté au jus d'embryons, l'extrait de foie ne manifeste aucune action néfaste sur les cultures;

— il suffit d'ajouter à l'extrait de foie une solution de cystéine à 3 % pour élever le taux de bonnes cultures de 29 à 66 %.

L'extrait de foie n'est donc pas toxique, mais simplement insuffisant.

Cette insuffisance n'est pas particulière à l'extrait de foie de Poulet. P. BARONE (1956) étudie l'activité des extraits de foie de rat normal et en régénération sur des cultures de foie embryonnaire de Poulet. Il montre que seuls les explants cultivés sur extrait de foie en régénération survivent et gardent une structure organotypique.

Au cours de nos expériences nous n'avons pas noté d'effet sélectif. Le pourcentage de nécrose est fonction de la sensibilité des organes mis en culture. Cette sensibilité est la même vis-à-vis de tous les milieux. Toutefois l'évolution particulière de fragments de poumon sur extrait de poumon mérite d'être signalée. Bien qu'observée sporadiquement sur d'autres milieux, la dispersion du mésenchyme pulmonaire est très caractéristique et pratiquement constante sur extrait de poumon. Sommes-nous là en présence d'un antagonisme spécifique ? Tout porte à le croire, mais il serait difficile de l'affirmer avec certitude. Des recherches ultérieures devront préciser si l'extrait de poumon contient vraiment un inhibiteur chimique, ou si l'action sur le mésenchyme est due à des propriétés physiques de l'extrait, telles qu'une plus grande viscosité ou tout autre facteur encore insoupçonné.

Dans les cas où nous avons pu observer la différenciation d'un tissu ou

d'un organe en présence de l'extrait homologue, les résultats ont été variables. La peau, aussi bien que les muscles et le cartilage se sont très bien différenciés en présence de leurs extraits respectifs. Dans un même ordre d'idées, W. WEISSHAUPT (1950) rapporte que la différenciation de l'os et de la moelle de phalanges d'embryons d'Oiseaux cultivés *in vitro* est plus rapide sur des milieux additionnés d'extraits osseux. Non seulement l'extrait d'os n'inhibe pas la différenciation, mais il la stimule. Les battements du cœur, par contre, sont inhibés par la présence d'extrait de cœur âgé. De même, le mésenchyme pulmonaire semble inhibé par l'extrait de poumon.

De nombreux travaux ont montré que la différenciation et la croissance s'accompagnent de mécanismes très variés : apparition et disparition de protéines, variations du taux de certaines protéines et transformations structurales de ces dernières. La synthèse protéique est ainsi plus complexe qu'on ne le pensait, et on ne peut en donner un schéma unique et commun à tous les cas.

En dehors de certains besoins communs, des organes différents requièrent pour leur différenciation et leur croissance des substances différentes.

Alors que dans nos expériences, le cartilage s'est différencié sur le seul milieu standard, la syrxix ne différencie ses cartilages qu'en présence de sérum homo ou hétérologue ou d'un apport d'acides aminés (EM. WOLFF, 1954). De même, les hormones seules ne suffisent pas à la différenciation des gonades *in vitro*, mais encore faut-il que les organes se trouvent dans des conditions de nutrition appropriées (K. STENGER-HAFFEN, 1957).

Tous ces facteurs interfèrent, et il est souvent difficile de déterminer le rôle qui incombe à chacun. Comme pour les phases initiales de la différenciation, les facteurs qui régissent la régulation de la croissance des organes différenciés paraissent très complexes. S'il est des types cellulaires qui sécrètent leurs propres inhibiteurs, ceci ne semble pas être le cas pour tous les organes. Il semble que d'une façon générale l'activité métabolique, non seulement de l'organe, mais aussi des territoires voisins et de l'embryon entier, doit être en cause. Ainsi après ablation d'un rein, le déséquilibre produit sur tout l'organisme solliciterait l'organe restant à reprendre sa croissance.

En conclusion, résumons les différents points essentiels énoncés au cours de cet exposé :

— Les extraits de foie et de rate, injectés à de jeunes embryons de Poulet, stimulent faiblement, mais de façon constante, la croissance de l'organe homologue.

— Des extraits d'organes permettent en général la survie de l'organe homologue et d'autres organes cultivés *in vitro*. Les extraits de foie et de cœur cependant sont insuffisants, et l'extrait de poumon inhibe le mésen-

chyme pulmonaire. L'activité stimulatrice des extraits d'organes en culture n'est pas démontrée.

— L'idée de l'existence d'un principe autorégulateur de la croissance ne peut s'étendre à tous les organes. Si le cœur et le poumon sont inhibés par la présence de l'extrait homologue, la différenciation de la peau, des muscles et du cartilage n'est pas affectée par la présence des extraits correspondants.

RÉSUMÉ

L'administration par la voie circulatoire d'extraits de foie et de rate à des embryons de poulet détermine de façon constante une augmentation de la croissance de l'organe homologue. Les effets ne sont toutefois pas complètement spécifiques, l'extrait de foie agissant sur la croissance de la rate, et vice versa. Mais les effets non spécifiques sont très variables et ne peuvent être considérés comme significatifs.

Des injections de sérum antifoie stimulent aussi la croissance du foie chez l'embryon. Bien que ce résultat ne soit pas statistiquement significatif, il faut insister sur la constance des effets observés.

La culture d'organes *in vitro* montre que, les extraits de foie et de cœur mis à part, tous les extraits étudiés (extrait de cerveau, d'intestins, de peau, de poumon et de mésonéphros) sont aussi efficaces que l'extrait total d'embryons, et permettent la survie de l'organe homologue et d'autres organes. Il faut cependant signaler l'inhibition de fragments de poumon cultivés sur extrait homologue.

La dégénérescence des organes sur extrait de foie est due, non à un effet toxique, mais à la déficience alimentaire du milieu. L'extrait de foie n'est pas inhibiteur. Une action stimulatrice éventuelle sur les cultures d'organes *in vitro* n'a pas pu être démontrée.

Les cultures de fragments de peau d'embryons de 6 à 7 jours et de l'ensemble « moelle-chorde-somites » d'embryons de 20 à 30 somites montrent que la différenciation des germes plumaires, du système musculaire et du cartilage n'est pas inhibée par la présence des extraits correspondants provenant d'embryons plus âgés.

Par contre, les battements de fragments de cœur sont inhibés par la présence d'extrait de cœur.

La discussion porte sur la nature et les mécanismes de la stimulation de la croissance des organes à la suite de l'incorporation de constituants cellulaires homologues. En ce qui concerne la régulation de la croissance des organes différenciés, il ne semble pas que l'idée de l'existence d'un principe autorégulateur puisse s'étendre à tous les types cellulaires.

BIBLIOGRAPHIE

- ANCEL (P.), 1953. — Les bases chimiques de la tératogénèse chez les animaux. *Revue de Pathologie générale et comparée*, **651**, 976-1002.
- ANDRES (G.), 1955. — Growth reactions of mesonephros and liver to intravascular injections of embryonic liver and kidney suspensions in the chick embryo. *J. Exp. Zool.*, **130**, n° 2.
- BARONE (P.), 1956. — L'azione dell'estrato di fegato rigenerante sul fegato embrionale di pollo coltivato *in vitro*. *Biol. Lati. Milano*, **9/3**, 399-416.
- BOGOMOLETZ (A. A.), 1943. — Antireticular cytotoxic serum as a means of pathogenic therapy. *Am. Rev. of Soviet Med.*, **1**, 101-112.
- BONETTI (D.), 1952. — Evoluzione epatica da stimoli epatosimili. *Boll. Zool. Ital.*, **19**, n° 4-6, 377-388.
- BRESCH (D.), 1955. — Recherches préliminaires sur les associations d'organes embryonnaires de Poulet en culture *in vitro*. *Bull. Biol.*, **139**, 179-188.
- BRUES (A. M.), JACKSON (E. B.) et AUB (J. C.), 1936. — Growth inhibitor in liver tissue. *Soc. Exp. Biol. Med. Proc.*, **34**, 270-273.
- 1940. — Growth inhibition by substances in liver. *J. Exp. Med.*, **71**, 423-438.
- BURKE (V.), SULLIVAN (N. P.), PETERSEN (H.) et WEED (R.), 1944. — Ontogenetic change in antigenic specificity of the organs of the chick. *Journ. Infect. Dis.*, **74**, 225-233.
- CROISILLE (Y.) et DEMAL (J.), 1955. — Cultures de foie sur des milieux à base de différents extraits d'organes. *C. R. Soc. Biol.*, **149**, n° 9-10, 1000-1003.
- DANTCHAKOFF (V.), 1916. — Equivalence of different hematopoietic anlagen (by method of stimulating their stem cells). 1. Spleen. *Am. Journ. Anat.*, **20**, 255-328.
- 1918. — Grafts of spleen on the allantois and response of the allantoic tissues. *Am. Journ. Anat.*, **24**, 127-189.
- DOLJANSKI (L.), 1929. — Cultures pures de tissu hépatique *in vitro*. *C. R. Soc. Biol.*, **101**, 754-755.
- 1929. — Sur la morphologie des cultures pures de cellules hépatiques *in vitro*. *C. R. Soc. Biol.*, **102**, 629.
- DOLJANSKI, HOFFMAN et TENENBAUM, 1939. — Stimulation de la croissance de colonies de fibroblastes *in vitro* par des extraits de tissus adultes. *C. R. Soc. Biol.*, **131**, 432-434.
- EBERT (J. D.), 1950. — An analysis of the effects of antiorgan sera on the development, *in vitro*, of the early chick blastoderm. *J. Exp. Zool.*, **115**, 351-378.
- 1951. — Ontogenetic change in the antigenic specificity of the chick spleen. *Physiological Zoology*, **24**, n° 1.
- 1955. — Some aspects of protein biosynthesis in development. (Aspects of synthesis and order in growth.) Princeton University Press.
- FISCHER (A.), 1922. — Cultures of organized tissues. *Journ. Exp. Med.*, **36**, 393.
- FOWLER (O.), 1937. — The influence of extracts obtained from different regions and different ages of chick embryos on the growth of fibroblasts. *J. Exp. Zool.*, **76**, 235-297.
- KAPEL (O.), 1926. — Sur la culture *in vitro* de tissu hépatique et pancréatique. *C. R. Soc. Biol.*, **95**, 1108-1109.
- 1929. — Einige Untersuchungen über das Verhalten des Epithels *in vitro*. *Arch. Exp. Zellforsch.*, **8**, 35-129.
- KIENY (M.), 1957. — Contribution à l'étude des besoins nutritifs de tibias embryonnaires d'Oiseau cultivés en milieux naturels et synthétiques. Sous presse.
- KINGSBURY, ALEXANDERSON et KORNSTEIN, 1956. — The development of the liver in the chick. *Anat. Rec. U. S. A.*, **124**, n° 2, 165-187.
- KIRRMANN (J. M.), 1955. — L'influence protectrice de la cystéamine contre l'action tératogène des rayons X. *Bull. Biol.*, **89**, 491-509.

- LANDSTEINER (K.), 1945. — The specificity of serological reactions. *Rev. ed.* Cambridge. Harvard University Press.
- LYNCH (R. S.), 1920. — The growth of embryonic chick liver in tissue cultures. *Anat. Rec.*, **18**, 249-250.
- MEDAWAR (P. B.), 1937. — A factor inhibiting the growth of mesenchyme. *Quart. Journ. Exp. Physiol.*, **27**, 147-160.
- METCHNIKOFF (E.), 1889. — Etudes sur la résorption des cellules. *Ann. Inst. Pasteur*, **13**, n° 10, 737-769.
- MORGAN, CAMPBELL et MORTON, 1955. — The nutrition of animal tissues cultivated *in vitro*. A survey of natural materials as supplements to synthetic medium 199. *Journ. Nat. Cancer Inst. U. S. A.*, **16**, 557-567.
- MURPHY (J. B.), 1916. — The effect of adult chicken organ grafts on the chick embryo. *Journ. Exp. Med.*, **24**, 1-6.
- NORDMAN (M.), 1929. — Wachstum und Stoffwechsel der Leberzellen in der Gewebeskultur. *Arch. Exp. Zellf.*, **8**, 371-414.
- OKKELS (H.), 1929. — Histochemische und mikrurgische Studien an Gewebskulturen von Lebergewebe. *Arch. Exp. Zellf.*, **8**, 432-442.
- POMERAT (C. M.), 1947. — Therapeutic possibilities of antiorgan sera. *Interne*, oct., 449-452.
- 1949. — Morphogenetic effects of spleen antigen and antibody administrations to chick embryos. *Exp. Cell Res.*, suppl. 1, 578-581. New-York, Acad. Press Inc.
- POMERAT (C.) et ANIGSTEIN (L.), 1944. — Antireticular immune serum : its action demonstrated by tissue culture technique. *Science*, **100**, 456.
- ROSE (S. M.), 1952. — An hierarchy of selflimiting reactions as the basis of cellular differentiation and growth control. *Am. Nat.*, **86**, 337-354.
- SENGEL (PH.), 1957. — Analyse expérimentale du développement *in vitro* des germes plumaires de l'embryon de Poulet. *Experientia*, **13**, fasc. 5, 177-182.
- STENGER-HAFFEN (K.), 1957. — Etude des besoins nutritifs des gonades embryonnaires d'Oiseau cultivées en milieux synthétiques. Sous presse.
- TROWELL (O. A.) et WILLMER (E. N.), 1939. — The effects of some tissue extracts on the growth of periosteal fibroblasts. *Journ. Exp. Biol.*, **16**, 60-70.
- TUMANISHVILI (G. D.), DZHANDIERI (K. M.) et SVANIDZE (I. K.), 1956. — La stimulation spécifique des organes de l'embryon de Poulet sous l'influence d'extraits de tissus (en russe). *Dokl. Akad. Nauk., S. S. S. R.*, **105**, 1107-1109.
- TYLER (A.), 1947. — An autoantibody concept of cell structure growth and differentiation. *Growth*, suppl. **10**, 7-19.
- VAKAET (L.), 1956. — Etude expérimentale par la méthode de cultures d'organes des réactions de l'épithélium bronchial de l'embryon de Poulet. *Arch. Anat. microsc. et Morph. exp.*, **45**, 48-64.
- WEISS (P.), 1947. — The problem of specificity in growth and development. *Yale Journ. Biol. Med.*, **19**, 235-278.
- 1952. — Selfregulation of organgrowth by its own products. *Science*, **115**, 487-488.
- WEISS (P.) et WANG (H.), 1941. — Growth response of the liver of embryonic chick hosts to the incorporation in the area vasculosa of liver and other organ fragments. *Anat. Rec.*, **79**, 62 (abstr.).
- WEISSHAUPT (W.), 1950. — Versuche über Wachstum und Differenzierung von Hühnchenphalangen *in vitro* und deren Beeinflussung durch Ossopan. *Vlg. Naturforsch. Ges. Zurich*, **95**, 197-211.
- WESTON (J. C.), 1956. — The effect of cortisone on some chemical constituents of developing chick liver. *Growth*, **20**, 75-90.
- WILLIER (B. H.), 1924. — The effects of thyroid grafts. *Am. Journ. Anat.*, **33**, 67-103.
- WILLIER, HARRISON et RAWLES, 1931. — Developmental relations of the heart and liver in chorioallantoic grafts of whole chick blastoderms. *Anat. Rec.*, **48**, n° 2.
- WOLFF (EM.), 1954. — Comparaison entre les valeurs nutritives de l'extrait d'embryons et des sérums dans la culture *in vitro* de la syrinx de l'embryon de Poulet. *C. R. Soc. Biol.*, **148**, 2078-2080.

- WOLFF (ET.), 1936. — L'évolution après l'éclosion des Poulets mâles transformés en intersexués par l'hormone femelle injectée aux jeunes embryons. *Arch. Anat., Histol. et Embryol.*, **23**, 1-28.
- 1953. — Principe d'une méthode de culture d'organes embryonnaires en milieux synthétiques. *C. R. Soc. Biol.*, **147**, 857.
- 1954. — Potentialités et affinités des tissus révélées par la culture *in vitro* d'organes en associations hétérogènes et xénoplastiques. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **79**, 357-369.
- WOLFF (ET.) et BRESCH (D.), 1955. — Sur les parabioses hétérogènes d'organes embryonnaires en cultures *in vitro*. *C. R. Acad. Sc.*, **240**, 1014-1016.
- WOLFF (ET.) et HAFEN (K.), 1951. — Sur la différenciation *in vitro* des gonades embryonnaires des Oiseaux. *C. R. Soc. Biol.*, **145**, 1388-1391.
- 1952. — Sur une technique permettant la culture *in vitro* des gonades embryonnaires des Oiseaux. *C. R. Acad. Sc.*, **234**, 1396-1398.
- 1952. — Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires *in vitro*. *Texas Rep. Biol. Med.*, **10**, n° 2, 463-472.

Imprimé par Soulis et Cassegrain, à Niort (France), 1959.

Dépôt légal : 1^{er} trim. 1959. N° d'ordre : 433.

Masson et C^{ie}, Edit., Paris. Dépôt légal : 1^{er} trim. 1959. N° d'ordre : 3257.

(Printed in France.)

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

**LES MÉTHODES SÉROLOGIQUES
APPLIQUÉES A L'ÉTUDE
DU DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE**

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 16 mars 1958.

*Le Doyen
de la Faculté des Sciences,*

J. PÉRÈS.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

*Le Recteur
de l'Académie de Paris,*

JEAN SARRAILH.

Printed in France.